FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

ANNEE 1966 N° 886

THÈSE

POUR LE

DOCTORAT EN MÉDECINE

DIPLOME D'ETAT

par

Jean-Maurice, Louis, Serge, LAVERGNE

né le 3 octobre 1936 à Toulouse

Présentée et soutenue publiquement le *1966*

UTILISATION DES MÉTHODES IMMUNOLOGIQUES POUR L'ÉTUDE DES PROTÉINES PLASMATIQUES DE LA COAGULATION APPLICATION A L'ÉTUDE DE LA PROTHROMBINE

Président : M. Jean BERNARD, Professeur

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41544321_0007

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

ANNEE 1966 N°

THÈSE

POUR LE

DOCTORAT EN MÉDECINE

DIPLOME D'ETAT

par

Jean-Maurice, Louis, Serge, LAVERGNE

né le 3 octobre 1936 à Toulouse

Présentée et soutenue publiquement le

UTILISATION DES MÉTHODES IMMUNOLOGIQUES POUR L'ÉTUDE DES PROTÉINES PLASMATIQUES DE LA COAGULATION

APPLICATION A L'ÉTUDE DE LA PROTHROMBINE

Président : M. Jean BERNARD, Professeur

UNIV.
LEIDEN

1/1/1966

PROFESSEURS HONORAIRES :

MM. Alajouanine (T.), Aubin (A.), Bénard (H.), Binet (L.), Bulliard (H.), Cathala (J.), Chabrol (E.), Chailley-Bert (P.), Debré (R.), Fey (B.), Gailliard (H.), Gaudart d'Allaines (F. de), Gennes (L. de), Halphen (E.), Hazard (R.), Heuyer (G.), Laroche (G.), Lavier (G.), Lelong (M.), Lévy-Solal (E.), Lian (C.), Marchal (G.), Mathieu (P.), Monod (R.), Moreau (R.), Moulonguet (P.), Pasteur Vallery-Radot, Petit-Dutaillis (D.), Plédelièvre (R.), Quénu (J.), Renard (G.), Richet (C.), Senèque (J.), Strohl (A.), Tanon (L.), Verne (J.).

DOYEN . . . . . Georges BROUET.

1er ASSESSEUR . . . . . Daniel BARGETON

2e ASSESSEUR . . . . . Jean GOSSET

I. — PROFESSEURS

1° CHAIRES DE SCIENCES FONDAMENTALES

a) Professeurs titulaires :

	MM.
Anatomie	DELMAS (A.)
Anatomie et cytologie pathologiques	DELARUE (J.)
Anesthésiologie	BAUMANN (J.)
Bactériologie et virologie	TOURNIER (P.)
Biochimie médicale	JAYLE (M.-F.)
—	POLONOVSKI (J.)
Biologie appliquée à l'Education physique et aux Sports	MALMEJAC (J.)
Biologie médicale	FAUVERT (R.)
Biophysique médicale	BUGNARD (L.)
—	DOGNON (A.)
—	DJOURNO (A.)
Cancérologie médicale et sociale	DENOIX (P.)
Chimie pathologique	SCHAPIRA (G.)
Embryologie	TUCHMANN (H.)
Génétique fondamentale	LEJEUNE (J.)
Histoire de la médecine et de la chirurgie	COURY (Ch.)
Histologie	GIROUD (A.)
Hygiène et médecine préventive	BOYER (J.)
Médecine du Travail	DESOILLE (H.)
Médecine légale	DEROBERT (L.)
Microbiologie (Bactériologie et virologie)	FASQUELLE (R.)
Parasitologie	BRUMPT (L.-C.)
Pathologie chirurgicale	LAURENCE (G.)
—	KUSS (R.)
—	VERNE (J.-M.)
Pathologie exotique	N...
Pathologie expérimentale et comparée	MERKLEN (F.-P.)
Pathologie médicale	LAROCHE (Cl.)
—	BRICAIRE (H.)
—	PÉQUIGNOT (H.)
Pathologie respiratoire	TURIAF (J.)
Pathologie et thérapeutique générales	N...
Pharmacologie	CHEYMOL (J.)
—	LEVY (Mlle J.)
Physiologie	BARGETON (D.)
—	PARROT (J.)
Physiologie et pathologie obstétricales	LEPAGE (F.)
Radiologie médicale	DESGREZ (H.)

	MM.
Technique chirurgicale et Chirurgie expérimentale	CAUCHOIX (J.)
Thérapeutique	CONTE (M.)
Thérapeutique appliquée	LAMOTTE (M.)

b) Professeurs à titre personnel :

Anatomie anthropologique	OLIVIER (G.)
Anatomie pathologique	NEZELOF (Ch.)
Bactériologie	BARBIER (P.)
Biochimie médicale	DESGREZ (P.)
	DREYFUS (J.-Cl.)
Biologie médicale	BOURLIÈRE (F.)
Histologie	COUJARD (R.)
Parasitologie	LARIVIÈRE (M.)
Pathologie expérimentale	LOEPER (J.)
	RICHET (G.)
Physiologie	DEJOURS (P.)
	ROUCAYROL (J.-Cl.)
	SCHERRER (J.)
Physique médicale	KELLERSHOHN (L.)
	GOUGEROT (L.)
	TUBIANA (M.)
Radiologie médicale	FISCHGOLD (H.)

2° CHAIRES DE SCIENCES CLINIQUES

a) Professeurs titulaires :

		MM.
Clinique carcinologique chirurgicale (Necker)		REDON (H.)
Clinique cardiologique (Broussais)		SOULIÉ (P.)
— — (Boucicaut)		LENÈGRE (J.)
Cliniques chirurgicales	Beaujon	LORTAT-JACOB (J.-L.)
	—	N...
	Cochin	LEGER (L.)
	Hôtel-Dieu	PATEL (J.)
	Saint-Antoine	GOSSET (J.)
	Salpêtrière	SICARD (A.)
	Tenon	OLIVIER (Cl.)
Clinique chirurgicale orthopédique et traumatologique (Cochin)		MERLE d'AUBIGNÉ (R.)
— — — (Foch)		PADOVANI (P.)
Clinique de chirurgie infantile et orthopédique (Enfants-Malades)		FÈVRE (M.)
Clinique de chirurgie cardio-vasculaire (Broussais)		DUBOST (Ch.)
Clinique de chirurgie pleuro-pulmonaire (Laennec)		MATHEY (J.)
Clinique dermatologique (Saint-Louis)		DUPERRAT (F.)
Clinique endocrinologique (Pitié)		DECOURT (J.)
Clinique de Génétique médicale (Enfants-Malades)		LAMY (M.)
Clinique gynécologique (Broca)		HUGUIER (J.)
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques (Saint-Louis)		DEGOS (R.)
Clinique des maladies des enfants (Enfants-Malades)		TURPIN (R.)
Clinique des maladies infectieuses (Claude-Bernard)		MOLLARET (P.)
Clinique des maladies mentales et de l'encéphale (Sainte-Anne)		DELAY (J.)
Clinique des maladies métaboliques (Necker)		HAMBURGER (J.)
Clinique des maladies du sang (Broussais)		BERNARD (J.)
Clinique des maladies du système nerveux (Salpêtrière)		CASTAIGNE (P.)
Cliniques médicales	Bicêtre	DEPARIS (M.)
	Broussais	MILLIEZ (P.)
	Cochin	BROUET (G.)
	Hôtel-Dieu	BARIÉTY (M.)
	Lariboisière	SÈZE (S. de)
	Pitié	DREYFUS (G.)
	Saint-Antoine	KOURILSKY (R.)
	Saint-Antoine	BOUDIN (G.)

	MM.
Clinique d'hydrologie et de climatologie (Bichat)	DEBRAY (Ch.)
Clinique médicale infantile et pédiatrie sociale (Enfants-Malades)	MARIE (J.)
Clinique médicale propédeutique (Broussais)	JUSTIN-BESANÇON (L.)
Clinique médico-sociale du diabète sucré et des maladies de la nutrition (Hôtel-Dieu)	DEROT (M.)
Clinique de neuro-chirurgie (Pitié)	DAVID (M.)
Clinique neurologique (Salpêtrière)	GARCIN (R.)
Cliniques obstétricales — Baudelocque	LACOMME (M.)
Cliniques obstétricales — Saint-Antoine	MERGER (R.)
Clinique obstétricale et gynécologique (Port-Royal)	VARANGOT (J.)
Clinique ophtalmologique (Hôtel-Dieu)	OFFRET (G.)
— — (Cochin)	BREGEAT (P.)
Clinique oto-rhino-laryngologique (Lariboisière)	AUBRY (M.)
Clinique de pédiatrie	MOZZICONACCI (P.)
Clinique de pédiatrie et de puériculture (Saint-Vincent-de-Paul)	THIEFFRY (S.)
Clinique de pneumo-phtisiologie (Laennec)	BERNARD (E.)
Clinique de neuro-psychiatrie infantile (Salpêtrière)	MICHAUX (L.)
Clinique de rhumatologie médicale et sociale (Cochin)	COSTE (F.)
Clinique stomatologique (Salpêtrière)	DECHAUME (M.)
Clinique thérapeutique chirurgicale (Vaugirard)	ROUX (M.)
Clinique thérapeutique médicale (Saint-Antoine)	LEMAIRE (A.)
Clinique toxicologique	GAULTIER (M.)
Clinique traumatologique et orthopédique (R.-Poincaré)	JUDET (R.)
Clinique urologique (Cochin)	ABOULKER (P.)
— — (Necker)	COUVELAIRE (R.)
Hygiène et clinique de la première enfance (Trousseau)	LAPLANE (R.)
Séméiologie médicale (A. Chantin)	DOMART (A.)
— — (Lariboisière)	BOUVRAIN (Y.)
— — (Pitié)	RAMBERT (P.)
— — (Rothschild)	WOLFROMM (R.)
Séméiologie et clinique chirurgicales (Broussais)	POILLEUX (F.)

b) Professeurs à titre personnel :

Hématologie	ANDRÉ (R.)
	BOUSSER (J.)
Hydrologie et climatologie	GIBERTON (A.)
Maladies infectieuses	BASTIN (R.)
Médecine	AZERAD (E.)
	BOUR (H.)
	CABROL (Ch.)
	GROSSIORD (A.)
	LAMBLING (A.)
	LAUNAY (Cl.)
	PAYET (M.)
	PERRAULT (M.)
	SIGUIER (F
	WORMS (R.)
Neuro-chirurgie	LE BEAU (J.)
Neurologie	LHERMITTE F.
Neuro-psychiatrie	PICHOT (P.)
Oto-Rhino-Laryngologie	MADURO (R.)
Pédiatrie	POLONOVSKI (Cl.)
	ROYER (P.)
Pneumo-Phtisiologie	KREIS (B.)
	MEYER (A.)
Rhumatologie	DELBARRE (F.)

II. — PROFESSEURS SANS CHAIRE

	MM.
Anatomie pathologique	GOUYGOU (Ch.)
Anesthésiologie	VOURC'H (G.)
Bactériologie	CHRISTOL (D.)
Biochimie médicale	CARTIER (P.) GONNARD (P.)
Biologie médicale	HARTMANN (L.)
Hématologie	BILSKI-PASQUIER (B.)
Maladies infectieuses	DUPONT (V.)
Physique médicale	COURSAGET (J.) GREMY (F.)
Physiologie	GIRARD (Fr.)
Stomatologie	CHAPUT (Mme A.)
Thérapeutique	CHASSAGNE (P.)

III. — PROFESSEURS DÉTACHÉS DANS LES UNIVERSITÉS ÉTRANGÈRES

Bactériologie	MAUDUROY (P.) Pr. s. ch
Pathologie chirurgicale	RUDLER (J.) Pr. s. ch.

IV. — PROFESSEUR ASSOCIÉ

Statistique médicale et épidémiologique	SCHWARTZ (D.)

Secrétaire général de la Faculté	M. LENA (J.)
Conseillers administratifs	Mlle CHAINTREUIL (G.) M. FAYE (R.)
Conservateur en Chef de la Bibliothèque Conservateur du Musée d'Histoire de la Médecine	M. le Docteur HAHN (A.)
Conservateurs	Mlles DUMAITRE (P.), LAURENT (H.), LE NOIR (G.),
Bibliothécaires	Mmes CONTET (J.), FORGET (F.), Mlles DUROZOY (M.-F.), ROBERGE (D.), Dr SCHILLER (J.)

Par délibération en date du 9 décembre 1798, l'Ecole a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées, doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation.

UTILISATION DES METHODES IMMUNOLOGIQUES

POUR L'ETUDE DES PROTEINES PLASMATIQUES

DE LA COAGULATION

APPLICATION A L'ETUDE DE LA PROTHROMBINE.

A Marina et à David

A mes parents

A mes beaux-parents

A tous ceux qui me sont chers

Au Docteur Carl-Antoine PIERSON

in memoriam

A Monsieur le Professeur Jean BERNARD

Professeur de Clinique des Maladies du Sang

qui m'a fait le grand honneur
d'accepter la présidence de
cette thèse.

Qu'il trouve ici l'expression
de ma respectueuse reconnaissance.

A Monsieur le Professeur Agrégé Jean-Pierre SOULIER

Directeur du Centre National de Transfusion Sanguine

qui m'a accueilli au Centre National de Transfusion Sanguine et qui a bien voulu me faire participer à ses recherches personnelles sur l'action de la staphylocoagulase.

Qu'il veuille bien trouver ici le témoignage de ma profonde reconnaissance.

A Monsieur le Professeur Agrégé Maxime SELIGMANN

qui a bien voulu guider mes premiers pas dans la recherche médicale.

En le remerciant de l'intérêt qu'il a bien voulu me porter, qu'il soit assuré de ma très vive reconnaissance.

A Monsieur le Docteur François JOSSO

qui m'a inspiré le sujet de cette thèse, m'a constamment guidé dans mon travail et dont les conseils éclairés m'ont été précieux.

En témoignage de ma reconnaissance et de mon attachement dévoué.

A Mademoiselle Colette WEILLAND

sans qui ce travail n'aurait pu
être mené à bien.

Qu'elle reçoive tous mes
remerciements avec l'espoir de
continuer cette fructueuse
collaboration.

A Madame PROU-MARTELLE
Madame BENAMOUN-DJIANE
Mademoiselle Suzette BEGUIN
Madame REGNIER
Mademoiselle Liliane HALLE
Madame FRANCOIS

ainsi qu'à Mademoiselle le Docteur Doris BENACHE

qui grâce à leur esprit d'équipe
m'ont aidé et soutenu dans ce travail.

A Monsieur le Professeur Agrégé J. CAEN

Madame le Docteur M.J. LARRIEU

Madame le Docteur Y. SULTAN

Madame le Docteur D. MEYER

A Monsieur le Professeur R. FASQUELLE

Monsieur le Docteur P. GOULET

Madame le Docteur PARIS-HAMELIN

Monsieur le Docteur VAISMAN

En reconnaissance de l'enseignement
qu'ils m'ont donné.

TABLE DES MATIERES

pages

- INTRODUCTION 1

- APPLICATION DES METHODES IMMUNOLOGIQUES AUX PROTEINES DE LA COAGULATION 3
  - Principes généraux 4
  - Données acquises
    - A. Fibrinogène 9
    - B. Facteur XIII 22
    - C. " VIII 24
    - D. " IX 28
    - E. " VII 30
    - F. " II 32

- ETUDE IMMUNOLOGIQUE DE LA PROTHROMBINE 37
  - Matériel 39
  - Méthodes 47
  - Résultats
    - A. Activité des anticorps vis à vis des propriétés "coagulantes" de la prothrombine et de la thrombine humaine 49
    - B. Recherche de l'activité des antocorps anti-prothrombine en milieu gélifié. 56
    - C. Spécificité d'espèce des anticorps anti-prothrombine 63
  - Discussion 65

- ACTION DE LA STAPHYLOCOAGULASE SUR LA PROTHROMBINE 69
  - Matériel 71
  - Méthodes 76
  - Résultats
    - A. Recherche de l'activité des anticorps en milieu gélifié (immunodiffusion). 77
    - B. Action des anticorps sur l'activité "coagulante" des divers antigènes... 78
    - C. Variation de l'activité des anticorps en fonction du rapport antigène-anticorps 82
    - D. Cinétique de l'action des anticorps vis à vis de la thrombine-coagulase. 85
  - Discussion 86

- CONCLUSIONS 88

- BIBLIOGRAPHIE

\+ \+
\+

INTRODUCTION

Dix protéines plasmatiques actuellement connues interviennent dans le processus conduisant à la coagulation du sang. Mis à part le fibrinogène, toutes ces protéines ne sont définies que par leur activité biologique. Cette activité "coagulante" est labile et ne peut être mise en évidence que dans certaines conditions de milieu. Elle exige pour se manifester l'intégrité structurale de la molécule et son absence ne préjuge en rien de l'absence de la protéine modifiée ou de produits en dérivant.

Les méthodes immunologiques définissent ces protéines selon un tout autre critère : leur possibilité de se combiner avec un anticorps spécifique. La pluparité des sites antigéniques sur chaque molécule confère à la méthode une grande sensibilité. Elle permet de reconnaître une molécule ayant perdu son activité biologique et d'en détecter l'existence dans des milieux impropres à un dosage biologique.

../...

Dans une première partie, nous exposons les différentes possibilités des méthodes immunologiques ainsi que les résultats qu'elles ont déjà apportés dans l'étude des protéines plasmatiques de la coagulation. La deuxième partie comprend l'exposé de nos recherches personnelles sur la prothrombine et sa transformation en thrombine ainsi que l'étude du support de l'activité thrombique résultant de l'action de la staphylocoagulase sur le plasma.

APPLICATION DES METHODES IMMUNOLOGIQUES

AUX PROTEINES DE LA COAGULATION

PRINCIPES GENERAUX.

Les protéines plasmatiques de la coagulation sont de connaissance récente. C'est à Morawitz, en 1905, que revient le premier schéma cohérent de la coagulation où un facteur tissulaire transformait la prothrombine en thrombine, elle-même transformant le fibrinogène en fibrine. Seuls le fibrinogène, la fibrine et la thrombine étaient alors des entités connues. En 1935, Quick proposa la première méthode de mesure de la prothrombine. Les autres facteurs plasmatiques V, VII, VIII, IX, X, XI et XII, ne furent définis que par l'absence congénitale héréditairement transmise d'une "activité" plasmatique nécessaire à la conversion de la prothrombine en thrombine. Le facteur XIII fût découvert dans le plasma comme étant nécessaire à la constitution de la fibrine physiologique, et son déficit congénital fût observé plus tard.

Depuis, les supports de ces activités biologiques ont été isolés et purifiés de façon plus ou moins poussée et le mécanisme de leur action soumis à l'analyse expérimentale. Mais la définition par la seule activité "coagulante" aboutit parfois à des impasses. Labile, cette activité est altérée,

../...

voire abolie au cours des processus d'isolement et de purification, de même qu'elle peut être modifiée ou abolie dans les conditions physiologiques de la coagulation sans que pour cela son support moléculaire ait forcément disparu. Etroitement dépendante du milieu, les méthodes visant à la détermination de l'activité coagulante sont également de sensibilité plus ou moins limitée selon les facteurs. Un exemple illustre les difficultés rencontrées : les facteurs VII, IX et X sont considérés comme des entités définies par la plupart des auteurs mais sont encore considérés comme des dérivés de la molécule de prothrombine apparaissant au cours de la coagulation par Seegers et son école.

Il est donc nécessaire de disposer d'autres moyens de caractérisation. Les protéines possèdent un certain nombre de sites antigéniques en règle générale indépendants du site supportant l'activité biologique. Le principe de la méthode immunologique est la caractérisation de ces molécules protéiques par l'étude de la possibilité d'union de leurs sites antigéniques avec des anticorps spécifiques.

La caractérisation d'une molécule par son pouvoir de se lier à un anticorps spécifique peut apporter à l'étude des protéines de la coagulation de multiples possibilités :

../...

- Identification et éventuellement dosage d'une protéine à l'état de traces dans le plasma ou le sérum.

- Caractérisation d'une protéine dans des milieux impropres aux dosages biologiques tels que les coupes de tissus ou les supports d'électrophorèse.

- Etude de la structure moléculaire par scission ménagée de la molécule et détermination des propriétés antigéniques des fragments obtenus.

- Caractérisation de la protéine quand elle a perdu son activité biologique, notamment lors de l'inactivation physiologique au cours de la coagulation ou d'une dégradation éventuelle au cours des processus de purification.

- Application en clinique à l'étude des déficits congénitaux avec différenciation des déficits quantitatifs ou purement qualitatifs ; mise en évidence éventuelle dans le sang de produits de dégradation susceptibles d'interférer dans le processus normal de la coagulation.

- Isolement d'une protéine de la coagulation par union avec son anticorps spécifique et possibilité de débarrasser complètement le milieu de cette protéine.

- Contribution à l'étude phylogénétique des protéines.

../...

Le but de la méthode immunologique est la formation d'un complexe spécifique antigène-anticorps, suivie de sa caractérisation.

La première étape consiste à préparer un antigène d'immunisation aussi purifié que possible. Pour qu'un facteur de coagulation soit considéré comme pur au regard des méthodes de coagulation, il suffit que la préparation utilisée soit dépourvue d'autres facteurs ayant une action dans le processus de coagulation. Un antigène d'immunisation demande une purification beaucoup plus poussée.

Cette exigence pose un problème souvent difficile à résoudre pour les protéines de la coagulation qui, en dehors du fibrinogène, sont en très petite quantité dans le plasma. Certaines sont en outre instables et ont tendance à perdre leur activité coagulante si bien qu'elle sont "perdues" au cours des processus de purification. Ainsi pour plusieurs des facteurs de coagulation il est encore difficile d'obtenir un produit sans contaminants ou sans perte de l'activité biologique.

La purification de l'immun-sérum et l'obtiention d'un anticorps spécifique de l'antigène injecté se heurte également à une difficulté. Il est nécessaire

../...

d'éliminer les anticorps non dirigés contre l'antigène étudié. Il est théoriquement possible d'épuiser l'immunsérum par un matériel contenant les impuretés antigéniques et non les antigènes à étudier. Un tel matériel peut être soit quelquefois réalisé artificiellement, soit provenir de patient ayant un déficit congénital. Ceci implique que ce déficit congénital soit un déficit quantitatif et non qualitatif.

De nombreuses techniques ont été décrites en vue de caractériser le complexe antigène-anticorps formé. Nous ne ferons que donner les principales qui ont été utilisées par les auteurs dont les travaux seront cités:

- réactions de précipitation : précipitation en milieu liquide (49, 57) ou en milieu gélifié (22, 41, 82, 83, 84, 100, 134, 135, 137, 140).

- marquage des anticorps par un produit fluorescent (18, 20, 76, 94,) ou marquage soit des anticorps soit des antigènes par un isotope radio-actif (43, 130).

- réactions d'agglutination: notamment inhibition de l'hémagglutination passive des hématies tannées (13, 32, 123) ou agglutination conditionnée à l'aide de particules inertes recouvertes de l'antigène étudié(111).

- fixation de l'anticorps sur un support insoluble (17, 42).

L'utilisation de ces différentes méthodes sera envisagée à propos des travaux consacrés à l'étude immunologique des protéines de la coagulation.

../...

DONNEES ACQUISES

De toutes les protéines plasmatiques de la coagulation actuellement dénombrées, l'étude immunologique des facteurs V, X, XI et XII n'a pas encore été entreprise à notre connaissance. Une revue de la littérature apportant les données acquises sur les autres facteurs constitue la première partie de notre exposé.

A. - FIBRINOGENE.

Le fibrinogène tient dans le processus de la coagulation une place à part. La transformation du fibrinogène en fibrine est le seul moment visible de la coagulation. Il existe en quantité importante dans le plasma ce qui permet de le purifier plus facilement. Présent dans le plasma, il est normalement totalement absent du sérum. Le fait qu'il soit également un bon antigène a permis des études immunochimiques particulièrement poussées depuis plusieurs années.

L'obtention d'anticorps anti-fibrinogène se heurte à la difficulté retrouvée à propos de toutes les protéines de la coagulation. Les préparations de fibrinogène injectées à l'animal d'expérience sont a priori impures et ont toutes chances d'être contaminées par différentes autres protéines dont le facteur VIII, le facteur XIII et le plasminogène. Il devient dès lors nécessaire d'absorber les

.../..

immuns-sérums obtenus par du sérum humain normal ou mieux par du plasma de malade atteint d'afibrinogénémie congénitale. Comme le font remarquer Seligmann et Marder (IIO), il est certain que la seconde solution est la meilleure, les protéines ayant une affinité pour le fibrinogène étant en grande partie absorbées sur la fibrine du caillot.

Barnhart et coll. (5) ont pu grâce à la bonne antigénicité du fibrinogène, obtenir des anti-sérums avec des doses très faibles quelques centaines de microgrammes de protéines. Cependant, ils n'épuisèrent pas ces anti-sérums ; aussi leurs conclusions, uniquement basées sur les lignes de précipitation obtenues par double diffusion ou immuno-électrophorèse, restent sujettes à caution.

I. - DOSAGE IMMUNOLOGIQUE.

De nombreux auteurs ont utilisé la méthode immunologique pour le dosage du fibrinogène dans le plasma. Les procédés employés furent la précipitation en milieu liquide avec mesure de l'azote ou des protéines du précipité et la floculation des particules de latex recouvertes de sérum anti-fibrinogène. La sensibilité de la méthode est très grande puisqu'elle a permis notamment à Hitzig (5I) et à Seligmann (IIO) de doser des quantités aussi faibles que IO gammas par ml de plasma. Hardisty et Pinniger (48) jugent leur méthode capable de déceler seulement 50 gammas par ml et dans leur

../...

cas d'afibrinogénémie congénitale concluent à une déficience absolue en fibrinogène, contrairement à Seligmann (IIC) qui en dosant le précipité obtenu avec un sérum anti-fibrinogène et en se référant à une courbe étalon en zone d'excès d'anticorps, trouve dans deux cas de grande afibrinogénémie congénitale des taux de IC à 20 gammas par ml de plasma.

2. - SYNTHESE DU FIBRINOGENE ET REPARTITION DANS L'ORGANISME

Straub (I26) en incubant des coupes de foie humain avec de la L-leucine C. I4 a obtenu avec un sérum anti-fibrinogène un précipité radio-actif, montrant ainsi que le foie synthétise le fibrinogène. C'est Barnhart et coll. (6) qui ont montré chez le chien par la méthode des anticorps fluorescents que seule la cellule parenchymateuse hépatique est responsable de la synthèse du fibrinogène, et particulièrement le ribosome. Après défibrination de l'animal, la fluorescence intra-hépatique atteint son maximum au bout de 5 h. 30 tandis que le taux de fibrinogène est restauré une heure après.

Gitlin et Borges (36) ont utilisé le dosage immunologique du fibrinogène pour étudier la décroissance du taux de fibrinogène circulant après injection intraveineuse de ce facteur chez deux enfants atteints d'afibrinogénémie.

Ils purent ainsi déterminer la répartition du fibrinogène dans le pool extravasculaire ainsi que la demi-vie du fibrinogène injecté. Ces résultats ont été ultérieurement confirmés après injection de fibrinogène marqué chez des sujets normaux.

A l'aide des anticorps fluorescents, Gitlin et coll. (35, 37), dès I953, montrent l'existence de fibrinogène dans les liquides extravasculaires. Gleye et Sandor (38) par immunoprécipitation arrivent à des résultats similaires et Barnhart (4) par immunofluorescence, trouve, dans les situations de coagulation intravasculaire, une fluorescence au niveau des polynucléaires neutrophiles.

Les travaux les plus nombreux ont recherché le fibrinogène au niveau des parois vasculaires et des plaquettes. Dans son ouvrage, Scott Blai (I04) fait état de nombreux travaux dont ceux de Copley, Levene et Gross, où par immunofluorescence ces auteurs observent que le fibrinogène tapisse l'endothélium de tout vaisseau. Salmon (99) dans une étude plus récente montre que le fibrinogène est intimement lié à la paroi vasculaire. Ainsi un sérum anti-vaisseau donne en immunoélectrophorèse un arc de précipitation avec le fibrinogène.

Si, dès I948, Ware et coll. (I36) avaient trouvé au niveau des plaquettes un produit coagulable qu'ils considéraient comme étant le fibrinogène, c'est Seligmann et coll. (I07), puis Salmon (96) qui mirent celui-ci en évidence au moyen d'anticorps anti-fibrinogène purifiés. Seligmann le retrouve dans des extraits plaquettaires humains et Salmon dans des extraits plaquettaires bovins. Par immunofluorescence, Sokal (II7) retrouve un antigène identique au fibrinogène dans les plaquettes et les mégacaryocytes. Si Salmon a émis l'hypothèse que le fibrinogène est intraplaquettaire, de nombreux auteurs pendent qu'il ne s'agit que d'une absorption du fibrinogène plasmatique.

Gocker et Yunis (39), en présence de trypsine et de plasmine, retrouvent, par anticorps fluorescents, le fibrinogène dans des plaquettes lavées. En utilisant la technique de double diffusion et l'immunoélectrophorèse, toujours en présence de trypsine détruisant le fibrinogène plaquettaire absorbé, Nachmann (75) confirme qu'il existe bien un fibrinogène intraplaquettaire. Caen et coll. (I6) par agglutination des particules de latex recouvertes d'anticorps anti-fibrinogène arrivent à cette même conclusion que si du fibrinogène plasmatique est absorbé sur la plaquette, il existe néanmoins un fibrinogène faisant partie intégrante de celle-ci ou du moins liée à elle de façon particulièrement étroite.

../...

3.- STRUCTURE ANTIGENIQUE DU FIBRINOGENE.

Se basant sur les travaux de Lapresle (59), Nussenzweig et coll. (79, 80) étudient la structure antigénique de la molécule de fibrinogène après scission protéolytique par la plasmine. Ayant préparé des immuns sérums anti-fibrinogène sans traces de thrombine, ils les font agir sur du fibrinogène natif ainsi que sur les produits de dégradation de ce fibrinogène par la plasmine. Les méthodes utilisées par ces auteurs sont la précipitation quantitative en milieu liquide et la précipitation en milieu gélifié.

Parmi les cinq fractions séparées par la chromatographie, seuls les composants appelés par eux D et E, se révèlent avoir des motifs communs avec le fibrinogène. Les trois autres fractions A, B et C ne précipitent pas avec les anticorps. Ils confirment le travail de Salmon (97) selon lequel la dégradation du fibrinogène entraînerait la disparition d'au moins un motif antigénique car l'ensemble des fractions est incapable d'inhiber totalement la réaction fibrinogène-immunsérum. Le fibrinogène comporterait au moins trois catégories de motifs anti-géniques : ceux réagissant immunologiquement avec le fragment D, ceux réagissant avec le fragment E et ceux ne réagissant avec aucun de ces deux fragments.

../...

Poursuivant son étude sur les constituants antigéniques du fibrinogène (8) ; Berglund avec Blombäck (IO), démontre que le fibrinopeptide B, détaché avec le fibrinopeptide A de la molécule de fibrinogène par la thrombine, devient antigénique lorsqu'on le combine à des particules d'acryl. Ils obtiennent un immun-sérum chez le lapin, immun-sérum ne réagissant pas avec le fibrinogène natif, ni le fibrinogène traité par l'urée ou la trypsine mais uniquement avec le fibrinogène traité par la plasmine. Le motif antigénique présent sur le fibrinopeptide B serait occlu dans la molécule de fibrinogène et ne serait démasqué que par la scission de celle-ci par la plasmine.

La cinétique de la dégradation du fibrinogène par la plasmine a été étudiée par la méthode immunologique combinée à l'électrophorèseet à l'ultracentrifugation par Nussenzweig et Seligmann (79) (I). Les caractères distinctifs des fragments D et E ont été précisés par ces auteurs puis par Lowis et Wilson (64). Mobilité électrophorétique, poids moléculaire, constante de sédimentation et thermolabilité les distinguent de même que l'immunoélectrophorèse à l'aide d'un

../...

Pour Seligmann et Marder (IIC), de nombreux produits intermédiaires ftraient avant la formation des fragments E et D. Le fragment D le premier à apparaître, puis le fragment E, mais il persisterait t un certain temps des fragments portant les motifs antigéniques des nts D et E ainsi que ceux n'appartenant ni à l'un ni à l'autre. Ce qu'au bout d'un certain temps que l'analyse immunoélectrophorétique la disparition de ce produit intermédiaire avec perte d'une rie de motifs antigéniques.

sérum anti-fibrinogène. La dégradation du fibrinogène entraîne l'apparition d'un inhibiteur de la fibrino-formation (77). Ils identifient cet inhibiteur au fragment D. Cette étude est poursuivie par Larrieu et coll. (60). Le temps de coagulation du fibrinogène par la thrombine est allongé aussi bien par le fragment D que par le fragment E. Seul le fragment D semble agir en inhibant la polymérisation de la fibrine et le fragment E semble agir comme une anti-chrombine vraie, inhibant également la génération de la thromboplastine. L'effet inhibiteur de l'ensemble des produits de dégradation du fibrinogène sur la fonction plaquettaire n'a pu être attribué à un fragment particulier.

Ces fragments E et E apparaissent homogènes à l'immunoélectrophorèse. Cependant, Jamieson et coll. (54) ainsi que Schwick et coll. (IC3) ont pu montrer après électrophorèse sur gel d'amidon du fragment D, l'existence de plusieurs bandes.

Salmon (97) avait pensé que grâce aux méthodes immunologiques, il serait possible de distinguer les produits de dégradation de la fibrine de ceux du fibrinogène. En fait, ni Nussenzweig et Seligmann (79) ni Salmon lui-même dans des travaux ultérieurs (98) n'ont pu obtenir cette distinction, les sérums anti fibrinogène se révélant incapables de distinguer le fibrinogène de la fibrine.

../...

Se basant sur ce fait que fibrinogène et fibrine comportent des déterminants antigéniques identiques, Wite et coll. (I38) ont étudié la structure du caillot de fibrine à l'aide d'un immunsérum anti-fibrinogène dont ils avaient marqué les anticorps par laferritine selon la technique de Singer et Schwick (II4). Combinant l'immunoélectrophorèse et l'analyse ultramicroscopique, ils confirment l'hypothèse de Hall et Slayter (45) selon laquelle les monomères de fibrine s'unissent par leurs extrémités et les filaments obtenus s'associent latéralement.

Nussenzweig et de Souza (8I) retrouvent par immunodiffusion que les motifs antigéniques communs entre le fibrinogène humain et le fibrinogène bovin appartiennent à chacune des trois catégories précédemment décrites. Schwick (IC2) également par immunodiffusion, montre que la spécificité d'espèce est très faible puisque même le fibrinogène de poule est capable de réagir avec un sérum anti-fibrinogène bovin, sans étudier cependant les produits de dégradation.

../...

4. - PATHOLOGIE DU FIBRINOGENE

Fibrinogène du nouveau-né : Storb et coll. (I24) étudient les différences immunologiques entre le fibrinogène de l'adulte et celui du nouveau -né. Leur méthode utilisant la double diffusion en gélose et l'immunoélectrophorèse ne leur permet pas de noter des différences d'antigénicité entre ces ceux fibrinogènes.

Fibrinogènes anormaux : Un exemple de fibrinogène à propriétés biologiques anormales a été rapporté par Ménaché (72). L'étude immunologique pratiquée par immunoélectrophorèse ne montre aucune différence entre le fibrinogène normal et le fibrinogène du malade. Beck et coll. (7) ont également étudié un cas de fibrinogène anormal. Là encore, en double diffusion en gélose, existe une complète identité antigénique entre le fibrinogène normal et celui du patient. Par contre, de petites différences de migration sont reconnues en immunoélectrophorèse. Von Felten et coll. (28) ont également étudié un cas d'anomalie congénitale du fibrinogène et concluent à une complète identité antigénique entre celui-ci et le fibrinogène normal.

../...

Etudes des états de fibrinopénie aiguë : Les résultats de l'étude immunologique de la dégradation du fibrinogène par la plasmine ont été appliqués en clinique au diagnostic des états de fibrinopénies aiguës et de fibrinolyse. Il y a longtemps que des auteurs dont Garner (33), Jablonovitz (53) et Gaspary (34), par la technique de précipitation en milieu liquide avaient montré que les produits de dégradation du fibrinogène réagissaient avec les sérums anti-fibrinogène. Seligmann (168), dès 1958, préconisa d'utiliser la méthode immuno-chimique pour le diagnostic des états fibrinolytiques.

Seligmann et Nussenzweig, du fait de la longueur de la méthode immunoélectrophorétique, proposent pour le diagnostic de routine l'épreuve du ring-test. Il est nécessaire de travailler sur un sérum et non sur le plasma car l'immun-sérum réagit avec les produits de dégradation et avec le fibrinogène non dégradé. Certains produits de dégradation, et en particulier le fragment D, étant incorporés dans le caillot, ces auteurs jugent leur méthode non valable quantitativement mais l'élévation marquée du taux des produits de dégradation dans le sérum des malades atteints de fibrinolyse aiguë rendrait la méthode utile pour un diagnostic d'urgence.

../...

Salmon (99), Ferri et Ferreira (30) ainsi que Schwick (103) confirmèrent ces travaux par l'analyse immuno-électrophorétique du plasma et du sérum. Fischer et coll. (31) encombinant l'électrophorèse en gel d'acrylamide et l'immunoélectrophorèse sont arrivés au même résultat. Ces méthodes, cependant, ne peuvent servir à un diagnostic d'urgence. Ferreira et Murat (29) ont proposé un test de floculation et Seligmann (111) un test d'agglutination des particules de latex recouvertes de sérum anti-fibrinogène donnant un résultat rapide.

Nilhen et Nilsson (78) ont injecté au lapin des produits de dégradation et obtenu un antisérum anti-produits de dégradation. Ils ont étudié en double diffusion en agarose et en immunoélectrophorèse, selon la technique de Wadsworth et Hanson (135) la possibilité de démontrer l'existence de ces produits dans le sérum lors d'états fibrinolytiques spontanés ou induits. Ils purent ainsi retrouver ces produits chez des malades ayant seulement une activité fibrinolytique légèrement augmentée et un fibrinogène à un taux normal. Dans les états fibrinolytiques induits, ils retrouvent ces produits de dégradation même lorsque le taux du fibrinogène n'est abaissé que de 0.01 g. pour 100ml. La méthode se révèle donc très sensible et serait d'une certaine utilité en clinique.

../....

Selon Merskey et coll. (73), la technique d'inhibition de l'hémagglutination des hématies tannées représente la méthode la plus sensible et la plus spécifique. Cette technique décrite par Boyden (I3) a été appliquée par Fox et coll. (32) pour quantifier le fibrinogène. Lorsque les produits de dégradation sont en grande quantité, chacune des méthodes décrites précédemment permet de les reconnaître mais seule cette technique d'inhibition de l'hémagglutination pourrait les quantifier de façon précise lorsqu'ils sont en petite quantité, environ IOO g/ml dans le sérum ou moins.

Recherche d'une fibrinolyse physiologique : Le fait qu'il pourrait exister une fibrinolyse physiologique a été étudié par Schwick (IO3) et par Salmon (98). Ces deux auteurs auraient reconnu une certaine quantité de produits de dégradation dans le sérum normal. Schwick en a même apprécié la concentration à 300 gammas par ml. Cependant, leur méthodologie n'est présentée que de façon fragmentaire et Seligmann (IIO) n'a pu arriver aux mêmes conclusions. Pour ce dernier, la concentration des produits de dégradation, s'ils existent dans le sérum normal, serait inférieure à IO gammas par ml.

Fibrinopexie des tumeurs : Certains auteurs dont Day et Coll. (23) et Shaeffer (II2) en étudiant des lymphosarcomes

../...

expérimentaux chez le rat, ont reconnu que ces tumeurs sont riches en fibrine au moyen d'anticorps anti-fibrinogène marqués, et que cette fibrine provient du fibrinogène plasmatique. Une application possible serait le traitement de ces tumeurs au moyen d'anticorps anti-fibrinogène supportant une dose thérapeutique de radioactivité.

Inhibiteurs acquis du fibrinogène : Un cas d'afibrinogénémie congénitale avec apparition d'un anticorps antifibrinogène fut étudié dès 1957 par Brönnimann (15). Le sérum du malade précipitait in vitro le fibrinogène. De Vries et coll. (132) retrouvent également un anticorps antifibrinogène chez une jeune fille atteinte d'afibrinogénémie congénitale après transfusions de fraction I. Outre l'étude des réactions de précipitation en milieu liquide et en gel d'agar, de Vries trouve des tests cutanés positifs en injectant par voie intradermique des solutions de fraction I humaine. La cinétique de l'apparition de cet anticorps anti-fibrinogène, l'absence presque totale de sites antigéniques du fibrinogène dans le plasma d'afibrinogénémie, laissent à penser que le déficit existant dans ce syndrome serait d'ordre quantitatif.

B - FACTEUR XIII : facteur stabilisant de la fibrine (F.S.F.) fibrinase, facteur L.L.

Le facteur XIII suit le fibrinogène dans tous les processus de purification, à tel point que certains auteurs

../....

tels Lorand et Jacobsen (68) ont pu penser un moment qu'il faisait partie intégrante du réseau de fibrine. Cette hypothèse a été infirmée depuis mais il reste très difficile d'obtenir une préparation de facteur XIII non contaminée par le fibrinogène.

Cependant Loewi et coll. (66) ont pu obtenir un antisérum spécifique anti-facteur XIII qui ne donnait aucune réaction avec du fibrinogène purifié. Inversement, ils ont préparé un antisérum anti-fibrinogène qui ne réagissait pas avec le facteur XIII.

Parmi les nombreux cas de déficits congénitaux en facteur XIII connus actuellement, un seul a fait l'objet d'une étude immunologique. Hampton et coll. (46) ont rapporté le cas de deux frères atteints dont le plasma a été testé contre le sérum anti-facteur XIII de Loewi. Ce dernier a observé une réaction de précipitation. Trois hypothèses pourraient expliquer ce résultat paradoxal :

- ou erreur de diagnostic : les deux cas de Hampton et coll. s'éloignant sensiblement du schéma stéréotypé des autres observations connues.

- ou bien l'antisérum de Loewi n'est pas spécifique.

../...

- ou enfin la molécule est anormale, inactive biologiquement mais supportant des sites antigéniques communs à ceux de la protèine normale.

C. - FACTEUR VIII : facteur anti-hémophilique A.

L'étude immunologique du facteur VIII se heurte à de nombreuses difficultés. Sa purification n'est pas encore possible et les fractions plasmatiques riches en facteur VIII, telle la fraction I de Cohn, contiennent beaucoup d'autres protéines.

L'épuisement d'un immunsérum produit chez l'animal d'expérience est encore aléatoire. Aucun réactif artificiel dépourvu de facteur VIII n'a pu à ce jour être produit. Le plasma d'hémophile A, plasma déficient en facteur VIII biologiquement actif, serait idéal mais est-il également déficient en facteur VIII antigéniquement actif?

Richards et Spaët (93) préparent des immuns-sérums à l'aide de fraction I de Cohn représentant environ le quart de l'activité VIII du plasma originel. L'immunsérum donne un précipité avec la fraction I de Cohn. Son addition à un plasma normal réduit fortement la capacité de celui-ci de corriger la consommation de prothrombine d'un hémophile. Il apparait donc que cet immunsérum contient un inhibiteur de

../...

l'activité biologique du facteur VIII. Mais le précipité obtenu n'a aucune spécificité étant donné la forte contamination de l'antigène, en particulier par le fibrinogène.

Adelson et coll. (I) se sont servis de la méthode immunologique pour étudier la survie du facteur VIII ainsi que la répartition de ce facteur dans l'organisme. A l'aide d'une préparation de facteur VIII partiellement purifiée ils obtiennent un immunsérum qu'ils absorbent par du plasma d'hémophile. Dans un deuxième temps, ils injectent à des individus normaux un acide aminé marqué par le S. 35 et vingt quatre heures après ils injectentàun deuxième lot d'individus le plasma provenant des premiers, supposé contenir du facteur VIII marqué. La radioactivité liée au facteur VIII est précipitée par l'immunsérum. Cette méthode complexe, bien que séduisante, ne donne aucune assurance sur la spécificité du complexe antigène-anticorps obtenu. Par ailleurs, les résultats qu'obtiennent ces auteurs concernant la survie du facteur VIII sont très éloignés de ceux obtenus par l'injection de fraction I riche en facteur VIII chez les hémophiles (55).

L'épuisement par du plasma d'hémophile est mis en question par Shanberge et Gore (II3). Ayant obtenu un anticorps anti-VIII humain, ils testent celui-ci par précipitation en milieu liquide contre du plasma normal et

../...

obtiennent un précipité jusqu'à une dilution élevée. Mai si, au préalable, ils absorbent l'antisérum par un plasma d'hémophilie sévère toute réaction de précipitation disparaît.

Piper et Schreier (86) reprenant cette expérience, arrivent au même résultat, indiquant que le plasma d'hémophilie A contient autant de facteur VIII antigéniquement actif que le plasma normal. De ce fait, le plasma d'hémophilie A serait inapte à l'épuisement des immuns sérums à moins que deux groupes d'hémophilie A existent : ceux ayant une protéine antigéniquement semblable au facteur VIII normal et ceux ne possédant pas ces antigènes, hypothèse présentée par Fantl et coll. (27) à propos de l'hémophilie B.

Ayant produit un anticorps anti-VIII canin, Mac Lester et Wagner (69) démontrent que l'inhibiteur est neutralisé par du plasma canin normal et non par du plasma de chien hémophile. Même lorsque leur préparation de facteur VIII est cinquante fois plus concentrée que le plasma normal, aucune image de précipitation par micro-double diffusion en agar n'est obtenue. Pour ces auteurs, cela tient en partie à l'instabilité et à la concentration extrêmement basse du facteur VIII dans le plasma normal.

../...

Michael et Tunnah (74) obtinrent des préparations concentrées de facteur VIII bovin avec une purification assez poussée. Ils préparent des immuns-sérums selon la technique de Barnhart et coll. (5). En étudiant ces immuns-sérums en immuno-diffusion contre leurs préparations de facteur VIII, ils obtiennent trois lignes de précipitation dont une sûrement due au fibrinogène. Les préparations ont leur activité VIII abolie par chauffage à 58 °C pendant IO minutes et ils émettent l'hypothèse que le facteur VIII est peut-être précipité avec le fibrinogène à cette température. En étudiant une préparation de VIII avant et après chauffage contre leur anti-sérum, ils s'aperçoivent que des trois lignes obtenues avant chauffage, la plus petite des deux lignes non dues au fibrinogène est abolie après chauffage.

Berglund (9) propose de produire les immuns-sérums anti-VIII chez des lapins rendus tolérants au fibrinogène. Cette méthode aurait l'avantage de faire disparaître une des catégories d'anticorps parasites, mais comme l'ont montré Michaël et Tunnah, tout un groupe d'impuretés reste encore présent dans les préparations les plus pures.

../...

Une preuve supplémentaire de l'antigénicité du facteur VIII est apportée par l'existence chez l'homme d'inhibiteurs acquis du facteur VIII chez les hémophiles transfusés (63,26) d'une part et chez les sujets normaux (I4,24,67,II5) d'autre part. Les premiers de ces inhibiteurs ont été les mieux étudiés. Leur activité est supportée par les gamma-globulines (IgG) (40,6I,I28) et divers arguments autorisent l'hypothèse de leur nature immunologique. Suivant Goudemand et coll. (40), cette activité inhibitrice serait neutralisée par le plasma normal mais aussi par le sérum normal (dépourvu d'activité facteur VIII) et le plasma d'hémophilie A. Par contre, l'activité inhibitrice ne serait pas neutralisée par le plasma de sujets ayant une maladie de Von Willebrand avec déficit profond en facteur VIII.

En conclusion, les études immunologiques concernant le facteur VIII n'ont apporté jusqu'à présent que des résultats fragmentaires et de plus contradictoires. Certains d'entre eux laissent supposer qu'au moins certains hémophiles A auraient en circulation une protéine n'ayant pas l'activité biologique du facteur VIII mais certains de ses motifs antigéniques.

D. - <u>FACTEUR IX</u> : facteur anti-hémophilique B.

Les études concernant l'immunologie du

../...

facteur IX sont très limitées. Lewis et Didisheim (62) préparent leur facteur IX à partir de plasma citraté, recalcifié et absorbé par $BaSO_4$. Leur antigène est riche en facteur IX et contient également du facteur VII et un peu de facteur II. Injecté au lapin il permet d'obtenir un immunsérum inhibant l'activité biologique du facteur IX mais également celle du facteur VII. Ils achèvent la séparation des activités anti-VII et anti-IX par absorption différentielle.

Adelson et coll. (I) ont également étudié la survie et la répartition du facteur IX par la même méthode que pour le facteur VIII. Les mêmes critiques peuvent être faites ici.

Comme pour le facteur VIII, de nombreux cas d'inhibiteurs acquis du facteur IX sont décrits chez les hémophiles B transfusés (I9,47,70). La méthode proposée par Mc Lester et coll. (70) pour leur étude est particulièrement séduisante. Elle repose sur la fixation de l'inhibiteur à de la cellulose (I7,42) rendant celui-ci insoluble sans bloquer les sites anticorps.

L'étude de ces inhibiteurs anti-IX a permis à Fantl et coll. (27) d'émettre l'hypothèse que deux catégories d'hémophilie B pourraient exister. En effet, certains patients

../...

neutralisent l'inhibiteur comme un plasma normal, alors que d'autres en sont incapables. Il existerait des hémophiles B ayant dans leur plasma une protéine qui porterait des sites antigéniques semblables à ceux du facteur IX, et d'autres dépourvus à la fois de l'activité coagulante et de l'activité antigénique du facteur IX. Ces auteurs postulent que ceux du second groupe seraient ceux qui développent des anticoagulants circulants.

E. - FACTEUR VII : Proconvertine.

Les études immunologiques sur le facteur VII se résument pratiquement aux travaux de Prydz (90). La première difficulté rencontrée par cet auteur fût la purification de ce facteur. Grâce à une filtration sur Sephadex et une chromatographie (88,89), il réussit à obtenir une fraction riche en VII et libre de prothrombine, facteur anti-hémophilique B et facteur Stuart.

Les immuns sérums de lapin obtenus à l'aide de cette fraction (90) se révèlent spécifiques, leur adjonction à du sérum humain neutralisant le facteur VII sans diminuer le taux des autres protéines absorbables par le $BaSO_4$. Si cet immun-sérum est ajouté à un plasma de malade atteint de déficience en VII, congénitale ou provoquée par les anticoagulants, les anti-corps présents ne sont pas précipités. La

../...

déficience congénitale en VII serait donc une déficience quantitative dans le cas décrit par Prydz. Comme cet auteur le fait remarquer, cela n'est peut-être pas valable pour toutes les déficiences congénitales.

Lors de la prise d'antivitamine K, il n'y aurait pas de préfacteur VII, analogue à la préprothrombine postulée par Hemker et coll. (50), présentant une communauté antigénique avec la proconvertine, tout au moins dans les systèmes utilisés par Prydz. Ces anticoagulants pourraient agir en bloquant la synthèse de la protéine dans la synthèse hépatique et non en bloquant l'apparition du site biologique de la molécule.

Stormorken (I25) avait comparé les activités des facteurs VII de différentes espèces et avait conclu que la spécificité de la réaction thromboplastine tissulaire-proconvertine était due à des différences moléculaires de la proconvertine. Prydz et Fossen (9I), en étudiant cette spécificité d'espèce au moyen d'un antisérum de lapin anti-VII humain, notent une corrélation entre l'action biologique des sérums de singe, de cheval, de boeuf ou de rat et la capacité d'union antigène-anticorps. Les sérums ayant le plus grand pouvoir inhibiteur sur l'activité coagulante sont ceux qui ont la plus grande capacité d'union antigène-anticorps ; i.e. les structures responsables de l'activité antigénique

../...

sont en parallèle de la structure supportant l'activité biologique.

Seul le sérum de cheval présente une particularité inexpliquée par ces auteurs : son activité biologique est importante, l'antisérum anti-VII humain se révèle par contre incapable d'inactiver le VII équin. Le sérum de singe a la plus forte activité biologique et antigénique. Le facteur VII de boeuf, par contre, dont l'activité biologique est la plus basse, est incapable de s'unir aux anticorps anti-VII humain.

F. - FACTEUR II : Prothrombine.

La prothrombine fait partie d'un groupe de facteurs de la coagulation ayant certaines propriétés communes. La prothrombine comme les facteurs VII, IX et X, est absorbable par $BaSO_4$, $AL(OH)_3$, $Ca_3(PO_4)_2$. Tous ces facteurs sont également synthétisés dans le foie par un système dépendant de la vitamine K. Au regard de cette parenté, Seegers et ses élèves (IC6) défendent l'hypothèse que VII, IX et X seraient des produits dérivant de la prothrombine.

Dans le processus physiologique de la coagulation, l'activité des facteurs VII, IX et X reste présente dans le sérum tandis que la prothrombine en se transformant en thrombine n'est plus retrouvée dans le sérum qu'à l'état de traces. La thrombine est absorbée sur la fibrine et inactivée par l'antithrombine physiologique.

../...

Se basant sur ces particularités, Streuli (I27) dès I959, a entrevu la possibilité de purifier la prothrombine à la condition que les facteurs VII, IX et X soient différents antigéniquement de la prothrombine. Il immunise des lapins par une préparation de ces facteurs et obtient un antisérum qui se révèle libre d'anticorps anti-prothrombine et capable de précipiter tous les autres facteurs absorbables par $BaSO_4$. La préparation de prothrombine ainsi réalisée contenait moins de I % des autres facteurs VII, IX et X. Il poursuit la purification de sa préparation par une précipitation au point isoélectrique. En ajoutant des ions calciques et de la thromboplastine cérébrale à cette prothrombine, Streuli n'observe aucune formation de thrombine. Un système de coagulation complet est nécessaire. Ainsi Streuli démontre que prothrombine d'une part, proconvertine, facteur anti-hémophilique B et facteur Stuart-Prower d'autre part, sont des protéines différentes dans leur structure antigénique.

Schwick et Schultze (I0I) établirent à la même époque que la prothrombine elle-même est antigénique. Cependant, leur préparation de prothrombine, faite selon le procédé de Seegers, est peu purifiée et contient les autres facteurs absorbables par $BaSO_4$ en quantité suffisante pour provoquer chez l'animal d'expérience la formation d'anti-corps. Pour ces auteurs, la suppression des facteurs

../...

VII, IX et X dans la préparation de la prothrombine est quasi impossible sans dénaturer cette dernière. En fait, en suivant le raisonnement de Streuli, la préparation de prothrombine comme celle d'un immunsérum spécifique anti-prothrombine est possible par la méthode immunologique.

Barnhart et coll. (5) montrent que de très faibles quantités d'antigène sont nécessaires pour obtenir un immun sérum actif, i.e. que la prothrombine est un excellent antigène. Ils injectent à des lapins adultes des microquantités de prothrombine de l'ordre de 300 microgrammes avec $AL(OH)_3$ et obtiennent un immunsérum donnant en double diffusion une bande contre une préparation de prothrombine et en immuno-électrophorèse un seul arc dans la zone des alpha-$_2$ globulines. Cependant, la prothrombine préparée selon le procédé de Seegers, n'est pas pure et aucun épuisement de l'immunsérum n'est décrit dans la méthode. La disparition de l'activité "coagulante" de la prothrombine en présence de l'immun-sérum ne fût apparemment pas recherchée. Ainsi la spécificité de l'anticorps n'est pas démontrée et rien ne prouve que la ligne obtenue n'est pas due à une réaction impureté - anticorps anti-impuretés.

C'est pourtant à partir d'un immunsérum anti-prothrombine ainsi caractérisé qu'Anderson et Barnhart (2)

../...

ont étudié la localisation intracellulaire de la prothrombine chez le chien et le boeuf. Leur immunsérum ne réagit pas avec le fibrinogène ni avec l'albumine mais ne fût pas testé contre des facteurs également absorbables par $BaSO_4$. En mettant ces anticorps rendus fluorescents au contact de coupes de différents tissus, ils retrouvent la fluorescence uniquement dans des cellules du parenchyme hépatique. Mais les facteurs VII, IX et X sont également synthétisés par ces cellules. De ce fait, leurs conclusions ne sont peut-être pas applicables exclusivement à la prothrombine mais intéressent également ces facteurs.

Même si la spécificité de la méthode n'est pas démontrée, l'immunologie se révèle ainsi permettre une étude fort importante. Anderson et Barnhart (3) continuèrent leurs recherches selon cette technique en étudiant la synthèse de la prothrombine chez le chien soumis à un traitement par les anti-vitamine K. La préparation de l'immunsérum souffre des mêmes critiques que précédemment mais les auteurs pensent pouvoir distinguer la proconvertine de la prothrombine par leur cinétique de restauration après administration de vitamine K. La fluorescence maxima n'est atteinte qu'à la I2ème heure pour la prothrombine alors que le taux de facteur VII est normal dès la 5ème heure.

../...

Confirmant leur précédente recherche, ces auteurs montrèrent que seules les cellules du parenchyme hépatique synthétisaient la prothrombine. Cette synthèse n'est pas permanente et en temps normal seulement IO à 20 % des cellules stockent la prothrombine. Dans certaines conditions, la vitamine K peut stimuler cette synthèse et dans ce cas toutes les cellules produisent de la prothrombine. Cela permettrait de dissocier les atteintes parenchymateuses des déficiences en vitamine K. Dans les premières, atteinte cirrhotique par exemple, l'injection de vitamine K serait incapable d'augmenter la fluorescence.

ETUDE IMMUNOLOGIQUE DE LA PROTHROMBINE

Schwick et Schultze (101) ont montré que la prothrombine était antigénique. Nous nous proposons :

1°) de caractériser immunologiquement la prothrombine et de la doser dans le plasma normal ou pathologique à l'aide d'un sérum anti-prothrombine.

2°) d'étudier l'action sur la thrombine de ces immunsérums ainsi que le devenir de la molécule de prothrombine lors de sa transformation en thrombine.

Enfin, dans une étude séparée, nous essayerons de jeter quelques lueurs sur l'action de la staphylocoagulase sur la prothrombine.

M A T E R I E L

- Prothrombine brute : préparée au CNTS par Ménaché (sous presse) selon une technique dérivée de celle utilisée par Veilland et Soulier (I37).

Préparée à partir de plasma provenant de sang prélevé sur EDTA sodique. Un traitement préalable par la bentonite élimine du plasma la quasi totalité des facteurs VII, IX et X en laissant subsister une quantité appréciable de prothrombine. Celle-ci est absorbée sur du phosphate tricalcique dont elle est éluée par le citrate. La protéine active est précipitée de l'éluat par l'alcool.

- Prothrombine chromatographiée : préparée au CNTS par Benamon-Djiane (sous presse). La prothrombine brute est reprise contre un tampon phosphate-NaCl et soumise à une chromatographie sur colonne de DEAE-Séphadex. Les protéines sont éluées en faisant varier la force ionique du tampon par paliers. On obtient trois pics, l'activité de la prothrombine étant supportée par le troisième pic.

Nous avons utilisé trois lots de prothrombine chromatographiée :

.le lot P35 : concentration en protéines : 2.30 g/l
I,800 unités/ml de prothrombine par rapport aux 200 unités/ml d'un plasma normal.

.le lot P61 : concentration en protéines : 2.41 g/l
2,000 U/ml

.le lot P72 : concentration en protéines : 3.16 g/l
2,760 U/ml.

- Plasma normal : provenant de sang prélevé sur citrate trisodique 0.13 M (une partie pour neuf parties de sang).

- Plasma et sérum de déficit en prothrombine : plasma et sérum d'un sujet présentant un déficit congénital en prothrombine ; le plasma contient environ 10 % de l'activité en prothrombine d'un plasma normal ; le sérum provient de sang prélevé sur des traces de thromboplastine et ne contient plus aucune activité décelable. Le taux des facteurs VII, IX et X dans le plasma et dans le sérum est normal (56).

- Sérum débarassé artificiellement de la prothrombine résiduelle : provient de sérum humain normal (sang prélevé sur thromboplastine). A 9 ml de ce sérum, sont ajoutés 1 ml de plasma de lapin absorbé deux fois par $Ca_3(PO_4)_2$ (10 mg/ml), puis 0.2 ml de thromboplastine de lapin. Après 18 heures au bain-marie à 37°C, le caillot de fibrine formé est retiré et la préparation chauffée 15 minutes à 56°C. Cette préparation ne contient plus de traces appréciables de prothrombine.

../...

- Thrombine humaine : préparée à partir de plasma suivant la technique décrite par Biggs et Mac Farlane (II) : dans une préparation d'euglobulines, la prothrombine est transformée en thrombine par des traces de thromboplastine en présence de calcium. La thrombine est précipitée par l'acétone et extraite du précipité par une solution de NaCl 0.I5 M.

- Thrombine équine : Thrombase (R) Roussel

- Thrombine bovine : thrombine Roche

- Thrombine aviaire : thrombine de poule préparée par Ménaché suivant la technique utilisée pour la préparation de la thrombine humaine.

- Fibrinogène humain : préparé au CNTS par purification de la fraction I de Cohn ; solution à 0.2 % environ en NaCl 0.I5 M.

- PPSB : fraction plasmatique riche en facteurs II, VII, IX et X, obtenue par absorption de ces facteurs sur le phosphate tricalcique suivie d'une élution par le citrate puis d'une précipitation des protéines actives par l'alcool. L'activité de la fraction en ces quatre facteurs est environ 20 fois supérieure à celle d'un même volume de plasma normal (II9).

- CSB : fraction obtenue à partir du sérum suivant le même procédé, riche en facteurs VII, IX et X et ne contenant que très peu de prothrombine (II8).

- Trypsine : cristallisée Choay.

../...

IMMUNSERUMS ANTI-PROTHROMBINE

I) Techniques d'immunisation : Préparés à partir de prothrombine chromatographiée en immunisant des lapins mâles de 2Kg500 environ selon différentes techniques :

a) - Trois lapins, n° 7,8 et 9, furent immunisés contre la prothrombine chromatographiée lot P35, en utilisant l'adjuvant de Freund complet, le mélange étant réparti en IM à la racine de chaque membre selon le schéma :

	Jour J	J + 7	J + 14
Prothrombine P35	0.5 ml	I.0 ml	2.0 ml
Sérum physiologique	I.5 ml	I.0 ml	-
adj. de Freund	2.0 ml	2.0 ml	2.0 ml

Le sang fut recueilli une semaine après la troisième injection par ponction carotidienne. Les lapins avaient reçu environ 8 mg de protéines représentant I4,800 unités de prothrombine.

b) - Deux lapins n° I8 et I9, furent immunisés contre la prothrombine chromatographiée lot 72, également à l'aide d'adjuvant de Freund complet selon le schéma :

	Jour J	J + IO
Prothrombine P72	0.5 ml	0.5 ml
Sérum physiologique	I.5 ml	I.5 ml
adj. de Freund	2.0 ml	2.5 ml

../...

Le lapin n° I9 étant mort pour une cause inconnue, le sang du lapin n° I8 fut recueilli IC jours après la dernière injection. Il avait reçu environ 3 mg de protéines représentant 5,4CC unités de prothrombine.

c)- Deux lapins n° 2C et 2I, reçurent également le lot P72 mais en utilisant l'hydroxyde d'AI comme adjuvant :

	Jour J	J + IO
Prothrombine P72	0.5 ml	0.5 ml
Sérum physiologique	I.5 ml	I.5 ml
Al (OH)3	2.C ml	2.C ml

Sang recueilli IO jours après la seconde injection. Ces lapins avaient également reçu 3 mg de protéines représentant 5,4CC unités de prothrombine.

2°) Activité des immunsérums bruts : elle fut déterminée par leur action anti-thrombique. En effet, comme nous le verrons, les anticorps anti-prothrombine ont une activité inhibitrice vis à vis de la thrombine parallèle à l'activité anti-prothrombine. Il est techniquement plus simple de déterminer cette activité anti-thrombique. Le système utilisé fut le suivant :

../...

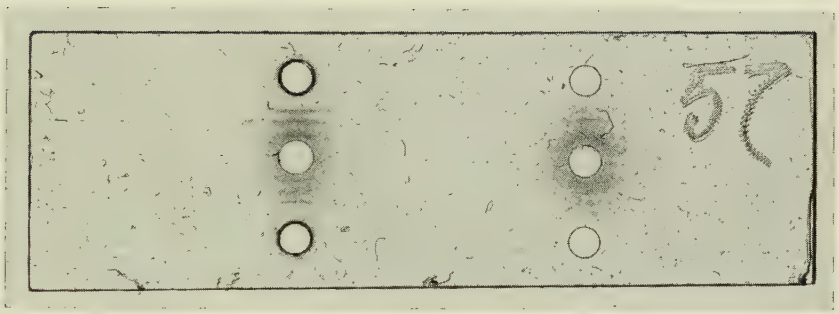


FIGURE 1

0.I ml d'immunsérum ou de tampon

0.3 ml de fibrinogène à 0.2 %

0.I ml de thrombine humaine.

tampon	I8"
Immunsérum n° 7	>2'
immunsérum n° 8	>2'
immunsérum n° 9	>2'
immunsérum n° I8	>2'
immunsérum n° 20	>2'
immunsérum n° 2I	>2'

Ces immunsérums bruts furent étudiés en immunodiffusion contre la prothrombine brute et la prothrombine chromatographiée. Comme le montre la figure (I) obtenue avec l'immunsérum n° 7, plusieurs lignes sont visibles avec les deux antigènes.

3°) - Epuisement des immunsérums : Cet épuisement fut conduit à l'aide d'un réactif déprothrombiné artificiellement. Les premières expériences d'épuisement avaient été faites à l'aide du sérum d'un malade atteint de déficit congénital en prothrombine qui était capable d'épuiser les anticorps non dirigés contre la prothrombine sans diminuer l'activité spécifique. Pour des raisons d'économie, nous avons été conduits à utiliser le réactif sans prothrombine décrit plus haut. Un sérum de lapin fut traité de la même manière afin de servir de témoin. (Tableau I)

../...

Volume d'immunsérum	1er épuisement		2° épuisement		3° épuisement		4° épuisement		5° épuisement	
	R:o,o5ml; IM:2ml 3o'a 37°C centrifugation		R:o.1ml; IM:2ml 3o' à 37°C centrifugation		R:o.1ml; IM:2ml 3o' à 37°C centrifugation		R:o.2ml; IM:2ml. 3o' à 37°C centrifugation		R:o.2ml; IM:2ml 3o' à 37°C + 24h à 4°C centrifugation	
	Quantité de Réactif	Précipité	Quantité de Réactif	Précipité	Quantité de Réactif	Précipité	Quantité de Réactif	Précipité	Quantité de Réactif	Précipité
n° 7 : 4o ml	1 ml	+++	2ml	+++	2ml	++	4ml	+	4ml	±
n° 8+9 : 4o ml	1	+	2	++	2	±	4	±	4	±
n° 18 : 5o ml	1.25	++++	2.5	++++	2.5	++	5	++	5	++
n° 2o : 5o ml	1.25	+	2.5	+	2.5	+	5	±	5	±
n° 21 : 5o ml	1.25	±	2.5	+	2.5	+	5	±	5	±
sérum lapin normal : 1oo ml	2.5	o	5	o	5	o	1o	o à ±	1o	o

poursuite de l'épuisement : cf

R = réactif déprothrombiné IM = immunsérum

TABLEAU I

L'épuisement de l'immunsérum n° 18 fut poursuivi:

- 6ème épuisement:

0.3 ml de réactif déprothrombiné (R) pour 2.0 ml d'immunsérum (IM);

30' à 37°C suivi de 24h à 4°C.

Précipité : ++

Contrôle de l'activité antithrombique:

tampon : 11" ; anticorps n° 18 : 10'

- 7° épuisement:

0.3 ml de R pour 2.0 ml d'IM;

48h à 4°C ; précipité : ++

activité antithrombique:

tampon : 11" ; n° 18 : 12'

- 8° épuisement:

0.4 ml de R pour 2.0 ml d'IM;

32h à 4°C ; précipité : ++

activité antithrombique:

tampon : 11"5 ; n° 18 : 15'

- 9° et dernier épuisement:

0.4 ml de R pour 2.0 ml d'IM;

30' à 37°C puis 6h à 4°C ; précipité : +

4°) - <u>Concentration des anticorps des immunsérums anti-prothrombine par le sulfate d'ammonium à 40% de saturation</u> :cette concentration a deux objectifs : concentrer les anticorps anti-prothrombine mais également se débarrasser de l'antithrombine physiologique progressive (antithrombine III du sérum).

../...

DEPART volume de sérum épuisé	OXALATE ml de Wintrobe liquide	ADSORPTION mg de $Ca_3(PO_4)_2$ 1 %	1ère PRECIPITATION		2ème PRECIPITATION		DISSOLUTION
			volume de sérum adsorbé*	ml de $(NH_4)_2SO_4$	précipité repris en sérum physio. q.s.p. *	ml de $(NH_4)_2SO_4$	ml eau distill. 1/5 du volume de départ
n° 7 46 ml	11.5 ml	575mg	52ml	34.6ml	52ml	34.6ml	9ml
N° 8+° 46 ml	11.5	575	5o	33.3	5o	33.3	9
n° 18 88 ml	22	1,ooo	95	63.3	95	63.3	17.5
n° 2o 6o ml	15	75o	7o	46.6	7o	46.6	12
n° 21 6o ml	15	75o	67	44.6	67	44.6	12
témoin 124 ml	31	1,55o	145	97	145	97	24.8
		1o'T°Labo 15' 3,6oo t/mn-0°C	goutte à goutte à 0°C avec agitat. 15' 3,6oo t/mn à 0°C		id.		Dialyse cf.

TABLEAU II

Le schéma d'épuisement est reproduit dans le tableau suivant. Après dissolution dans l'eau distillée, il fut procédé à une dialyse d'une heure sous eau courante, suivie d'une dialyse de 15h dans un premier bain de 5 litres de tampon TRIS-NaCl (force ionique 0. pH 7.3) à 0°C sous agitation constante. Trois autres bains de 1h chacun dans 2 litres de tampon TRIS-NaCl à 0°C sous agitation complètèrent la dialyse.

(Tableau II)

5°) - Contrôle de l'activité antithrombique des immunsérums après épuisement et concentration :

tampon		18"
gammaglobulines normales		18"
anticorps anti-II	n°7	30'
"	n°8-9 (pool)	<45'
"	n°18	30'
"	n°20	<45'
"	n°21	<45'

6°) - Dosage des protéines ; appareil Beckman, UV 280 mμ; cuves de 1 cm ; dilution des préparations au 1:100 en tampon TRIS-HCl, 0.2 M, pH 8 :

gammaglobulines normales	27 g/l
anticorps anti-II n°7	31 g/l
anticorps anti-II n°8-9(pool)	27.2 g/l
anticorps anti-II n°18	31.5 g/l
anticorps anti-II n°20	21 g/l
anticorps anti-II n°21	31 g/l

../...

METHODES

- Dosage de la Prothrombine : méthode en un temps selon Owren (85) et Koller (58) ; méthode en deux temps selon une technique adaptée de celle de Seegers (105). Par définition, une unité de prothrombine donne naissance à une unité de thrombine (N.I.H.). Par cette méthode, le plasma normal contient 200 ± 30 unités de prothrombine par ml.

- Mesure de l'activité thrombique : elle est définie par le temps de coagulation du fibrinogène (0.1 ml du produit à tester + 0.4 ml de fibrinogène à 0.2 %) rapporté à une courbe d'étalonnage obtenue dans le même système avec une thrombine d'activité connue (N.I.H.) et la mêmesolution de fibrinogène.

- Immunodiffusion : selon la technique d'Ouchterlony (83), sur plaques de verre recouvertes d'agarose, en tampon véronal-véronal acide-lactate de calcium, 0.1 M, pH 8.6. Après 20h de diffusion, les plaques sont lavées dans plusieurs bains de NaCl à 1 % et un dernier bain d'eau distillée. Les plaques sont, après séchage, colorées par l'amidoschwartz.

- Immunoélectrophorèse : selon la technique décrite par Grabar et Williams (41), sur plaques de verre de 7.3 X 2.5 cm recouvertes d'agarose en tampon véronal-véronal acide-lactate de calcium 0.1 M, pH 8.6 ; appareil LKB n°

../...

Après une heure d'électrophorèse de l'antigène sous 50 mA et 250 volts, la diffusion a lieu pendant 20h. Lavage, séchage et coloration sont identiques à la méthode précédente.

- Marquage de la prothrombine par l'iode radio-actif : dans certaines expériences d'immunodiffusion et d'immunoélectrophorèse, nous nous sommes servis d'une prothrombine marquée par ^{131}I. La prothrombine chromatographiée est radioiodée au CNTS (Benamon-Djiane, Drouhet, Amouch) selon la méthode de Hunter et Greenwood (52) modifiée utilisant la chloramine T. Après marquage, la prothrombine est rechromatographiée dans les mêmes conditions qu'avant marquage afin d'éliminer les produits de dégradation et est alors utilisée comme antigène. Après coloration, les plaques d'immunodiffusion et d'immunoelectrophorèse sont mises au contact d'un film photographique pendant une période de 48 heures.

R E S U L T A T S

Nous étudierons successivement :

- l'activité des anticorps vis à vis des propriétés "coagulantes" de la prothrombine et de la thrombine humaine.

- le pouvoir précipitant des anticorps en milieu gélifié vis à vis de ces mêmes antigènes.

- la spécificité des anticorps vis à vis de thrombines de différentes espèces animales.

A. - Activité des Anticorps vis à vis des propriétés "coagulantes" de la prothrombine et de la thrombine humaine.

(I) - Activité anti-prothrombine :

Cette activité est étudiée à l'aide de l'immun-sérum anti-prothrombine n° 20, épuisé et concentré. Cette action est déterminée sur le plasma normal et la prothrombine purifiée (lot P6I). Une solution de prothrombine de 200 U/ml est utilisée en prenant le plasma non dilué et la prothrombine diluée au I : IO. Le système est le suivant :

../...

0.3 ml de solution de prothrombine

0.3 ml d'anticorps ou de gammaglobulines normales au I :2

incubation de 30' à 37°C et dosage de la prothrombine résiduelle.

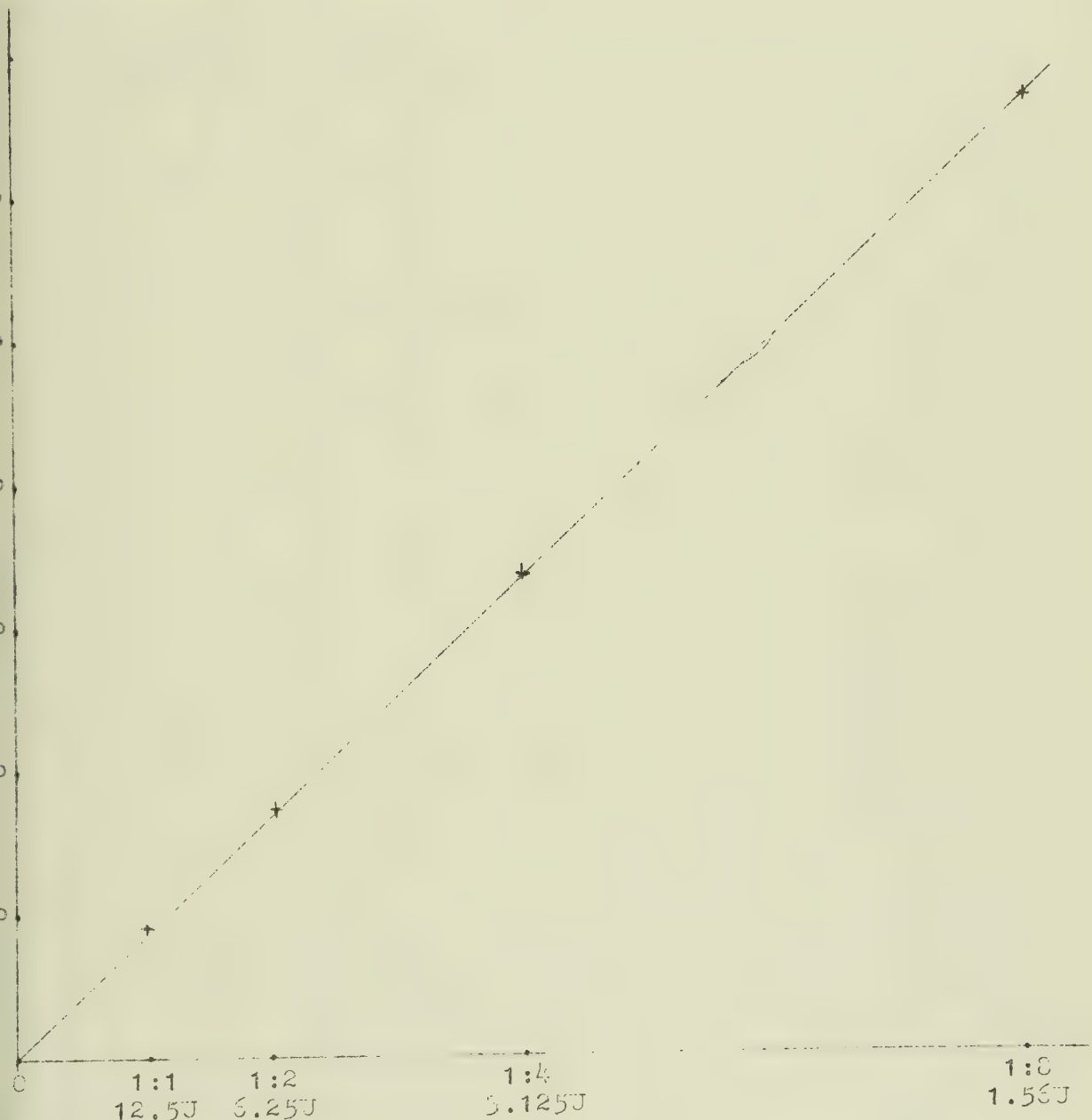
Dilution du mélange II + Ac	Plasma au I :2 gammas normales	anticorps anti-II	II chromato gammas normales	au I :20 anticorps anti-II
I/5	22"	28"	24"5	28"
I:10	27"	35"	29"	34"
I:20	35"	50"	39"	45"
Unités de Prothrombine	200	90	200	124

Il appert de ces résultats que les anticorps anti-prothrombine dilués au I:2, ont neutralisé 110 U de prothrombine dans le plasma normal alors que 76 U de prothrombine seulement ont été neutralisées dans le lot de prothrombine chromatographiée.

Ces résultats ont été retrouvés en se servant des anticorps anti-prothrombine n° 7, 8 et 9. L'hypothèse que

../...

Etalonnage de la thrombine
en présence de gamma-globuline de lapin
normale au 1:4,
après incubation.



Dilution de thrombine U / ml	Anticorps dilués au 1:4					Anticorps dilués au 1:1o				
	dilut. nles temps	anticorps anti-II nº 20 dilut.	temps	unités résidu.	unités consomm.	dilut nles temps	anticorps anti-II nº 20 dilut.	temps	unités résidu.	unités consomm.
non dilué 1oo U	1:1o 1o"	1:1o	12"5	86	14					
1:2 5o U	1:5 11"5	1:5	15"	35.5	14.5	1:5 11"	1:5	12"	44.5	5.5
1:4 25 U	1:5 2i"	1:5	46"	11	14	1:5 20"	1:5	27"	19.5	5.5
1:8 12.5 U	ND 9"	ND	1oo"			1:2 19"	1:2	35"	5.8	6.7
1:16 6.25 U	ND 17"	ND	2'			1:2 3o"	1:2	135"		
1:32 3.125U	ND 33"									
1:64 1.56 U	ND 67"									

1 ml de l'anticorps est capable de neutraliser environ 55 unités de thrombine

l'on peut avancer est que dans ce système où l'on dose la prothrombine active, une partie des molécules de prothrombine du lot chromatographié ont été rendues inactives lors de la purification sans perdre pour autant leurs sites antigéniques.

(2) Activité anti-thrombique des anticorps anti-prothrombine :

(a) Mesure de l'activité antithrombique : (tableau III)

L'activité anti-thrombique des anticorps a été déterminée vis à vis d'une préparation de thrombine humaine (IIC U/ml) par rapport à des gammaglobulines de lapin témoin. Le système utilisé est :

0.I ml de thrombine à différentes dilutions

0.I ml d'anticorps aux dilutions : I:4 et I:IC

L'activité thrombique du mélange est déterminée par rapport à la courbe d'étalonnage obtenue avec les gammaglobulines normales. (fig. 2).

(b) Neutralisation de l'activité anti-thrombique par la prothrombine :

Nous avons vu que lorsque l'on ajoutait en proportions convenables, l'anticorps à du plasma ou de la prothrombine purifiée une certaine quantité de prothrombine était neutralisée.

Après neutralisation de la prothrombine, le mélange n'a plus d'activité antithrombique résiduelle comme le montre la détermination respective de l'activité anti-thrombique d'un mélange à parties égales d'anticorps

../...

et de prothrombine, de gammaglobulines normales et de prothrombine, d'anticorps et de tampon. (Tableau IV).

	gammasG Nles + II	Anticorps + II	Anticorps + tampon
Activité en II	200 U	124 U	néant
Thrombine 100 U:ml: unités résiduelles	100 U	100 U	45 U

- Tableau IV -

(c) Cinétique de l'action des anticorps anti-II sur la thrombine humaine :

L'action inhibitrice des anticorps vis à vis de la thrombine se développe très rapidement. Ils ont en effet une activité de type immédiat qui nous a servi à tester le pouvoir inhibiteur des immunsérums bruts (riches en anti-thrombine progressive physiologique). Cependant déterminée avec des anticorps purifiés, cette activité inhibitrice demande un certain temps pour atteindre son maximum. (fig 3).

../...

Cinétique de l'action des anticorps anti-prothrombine sur la thrombine humaine.

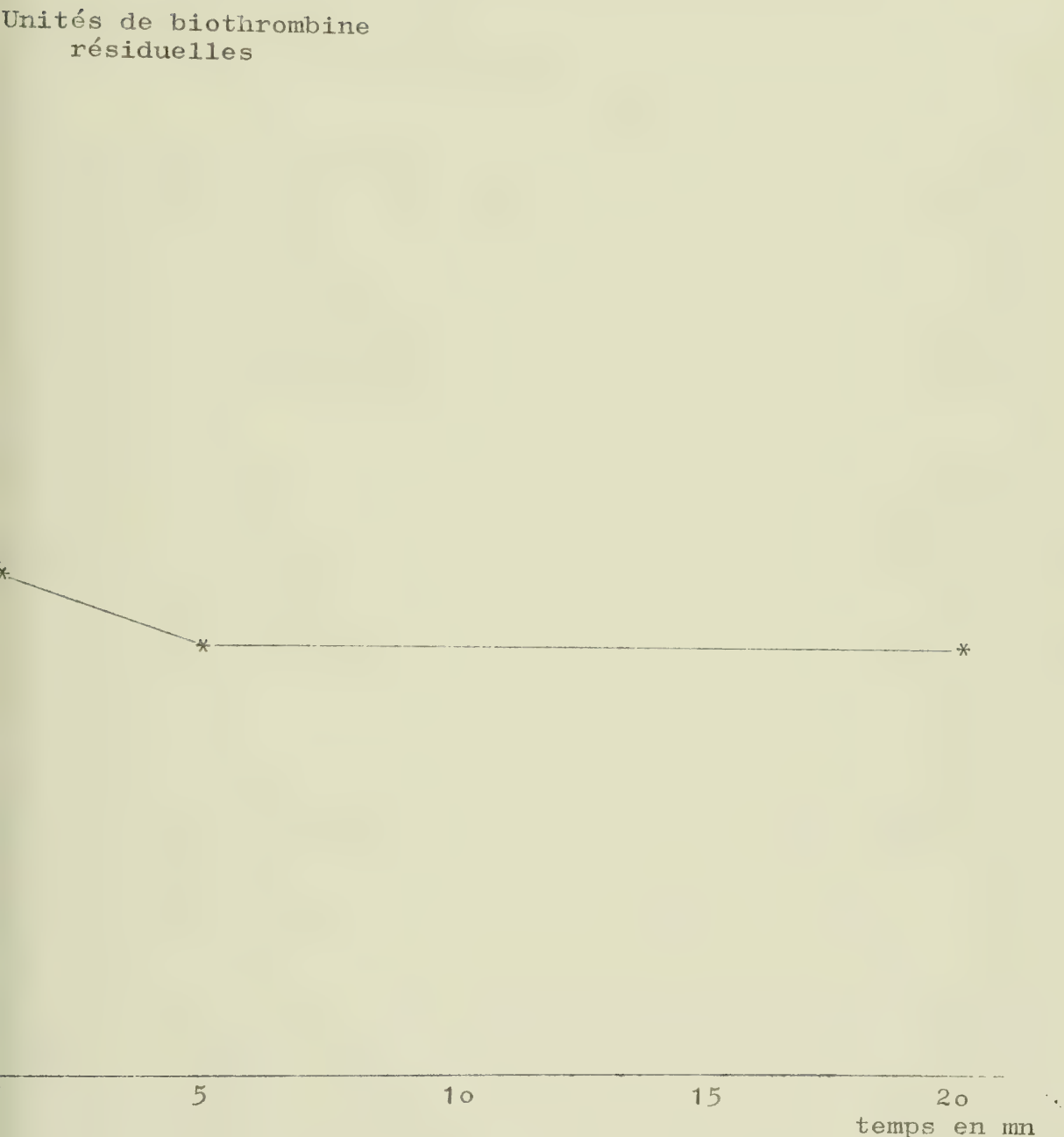


Figure 3.

(3) Comparaison entre l'activité anti-prothrombine et l'activité anti-thrombique :

L'activité inhibitrice des anticorps a été testée vis à vis de la prothrombine (plasma, prothrombine purifiée) et de la thrombine (thrombine purifiée). Dans ces expériences, décrites ci-dessus, il nous a paru que l'activité inhibitrice, rapportée au nombre d'unités inhibées par ml, était plus marquée vis à vis de la prothrombine que de la thrombine.

Pour que la comparaison soit valable, nous avons recommencé l'expérience en nous servant du même antigène, en testant l'anticorps contre la thrombine "native" obtenue en activant la prothrombine contre laquelle il était également testé.

Nous avons procédé de la manière suivante, en utilisant le système de dosage de la prothrombine en 2 temps :

a) Un plasma normal est incubé avec des gamma-globulines témoin ou des anticorps dans un rapport tel que la neutralisation de la prothrombine par ceux-ci ne laisse persister aucune activité antithrombique résiduelle.

La prothrombine contenue dans les deux mélanges est transformée en totalité en thrombine par un

../...

système d'activation (thromboplastine, calcium, facteurs V, VII et X). Le nombre d'unités thrombiques obtenu définit l'activité de la prothrombine. La différence d'activité constatée entre les deux mélanges définit l'activité inhibitrice de l'anticorps vis à vis de la prothrombine, ensuite ramenée au ml. (Tableau V).

b) - Dans le même système, la prothrombine du même plasma est directement convertie en thrombine et celle-ci est incubée avec des gamma-globulines témoin ou des anticorps avant d'être testée sur le fibrinogène. La différence d'activité constatée entre les deux mélanges définit l'activité inhibitrice de l'anticorps vis à vis de la thrombine, ensuite ramenée au millilitre. (Tableau VI).

Dans ces conditions il apparait encore que l'activité anti-prothrombique des anticorps est nettement plus importante que l'activité antithrombique. De plus l'activité observée vis à vis de chacun de ces deux antigènes est très comparable quelque soit le procédé expérimental utilisé.

../...

ncubation 3o' -37°C	dilution du plasma et de l'anticorps dans la mixture de thrombinoformation	temps de thrombine	unités	activité inhibitrice par ml
mma-G nles 2,1 partie asma, 1 partie	1:2oo	15"	1	-
ticorps 2o 2,1 partie asma, 1 partie	1:2oo	24"	o.65	15o Unités env.

TABLEAU V

Incubation 30'-37°C	temps de thrombine	Unités	Activité inhibitrice par ml
mixture activée 3 parties gamma-Globulines au I:25 I partie	I5"	I	-
mixture activée 3 parties anticorps n° 20 I:25 I partie	32"5	0.45	55 unités env.

- Tableau VI -

B. - Recherche de l'activité des anticorps anti-prothrombine en milieu gélifié.

(I) - PROTHROMBINE :

I°) Caractérisation :

Dans une première série d'expériences, nous avons utilisé un anticorps anti-prothrombine d'activité très faible qui après absorption par un réactif déprothrombiné ne donnait aucun arc de précipitation contre la prothrombine chromatographiée. Cette expérience a été refaite en double diffusion sur gel après marquage préalable de la prothrombine par I^{131}. En soumettant les plaques à l'autoradiographie, nous avons obtenu un arc parfaitement net (fig. 4 et 5). Cette expérience nous a montré qu'il était nécessaire d'obtenir des anticorps assez puissants pour que les arcs de précipitation soient visibles par les colorations habituelles.

Les anticorps anti-II n° 7 furent étudiés en immunoélectrophorèse à l'aide de prothrombine brute et de prothrombine chromatographiée marquées par l'iode radio-actif. Du PPSB fut adjoint comme contrôle (fig. 6 et 7).

../...

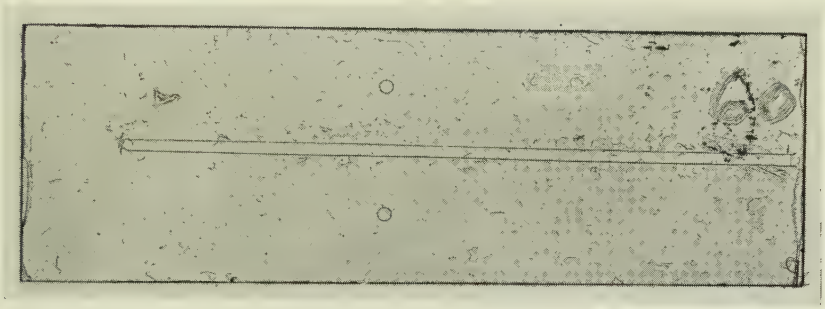


FIGURE 4

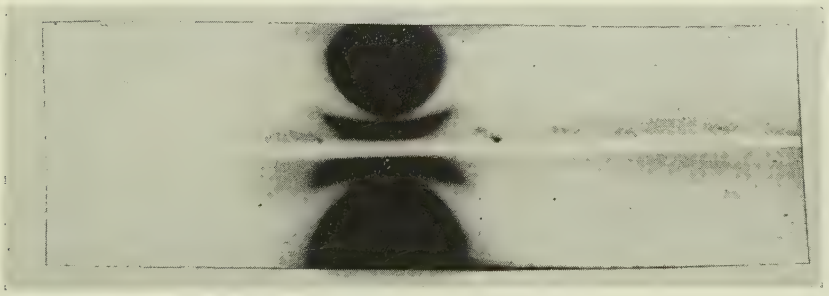


FIGURE 5

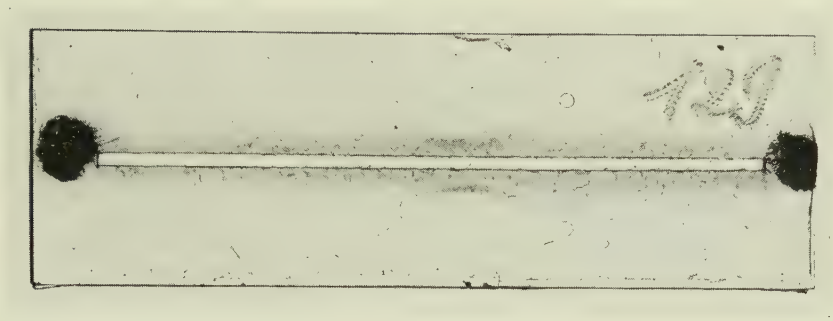


FIGURE 6

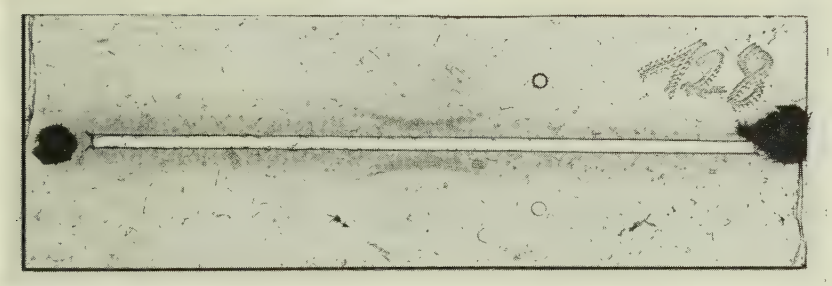


FIGURE 7

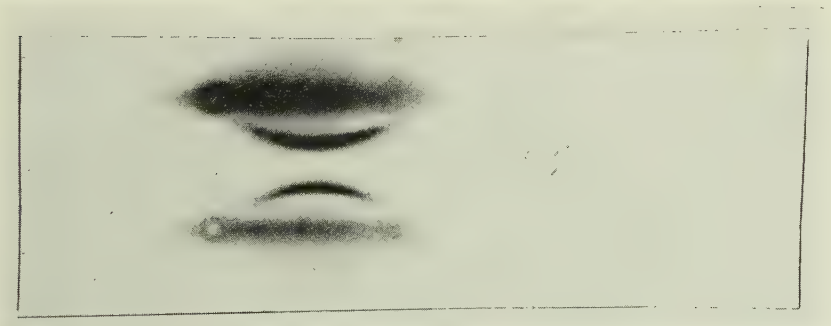


FIGURE 8

Une seule ligne fut obtenue avec chacun des antigènes étudiés. La radiophotographie de la plaque 129 de la figure (6) révélait également une seule ligne de précipitation avec les prothrombines brutes et chromatographiée. (fig. 8).

L'obtention d'une seule ligne de précipitation ne pouvait cependant suffire à prouver que cette ligne était bien due à la réaction anticorps-prothrombine. Une série d'immunoélectrophorèses à l'aide d'antigènes variés fut conduite en plaçant dans la rigole supérieure un sérum de cheval anti-sérum humain total (Amsterdam), et dans la rigole inférieure, les anticorps anti-prothrombine n° 20.

La figure (9) montre les résultats obtenus avec comme antigènes :

- le PPSB dans le réservoir supérieur ;
- un plasma normal dans le réservoir central ;
- la prothrombine chromatographiée, lot 72, dans le réservoir inférieur.

Une seule ligne est visible avec les anticorps anti-II contre la prothrombine chromatographiée et le plasma.

La figure (10) montre les résultats obtenus avec comme antigènes ;

- un sérum normal dans le réservoir supérieur
- le PPSB dans le réservoir central
- le réactif déprothrombiné dans le réservoir inférieur.

../...

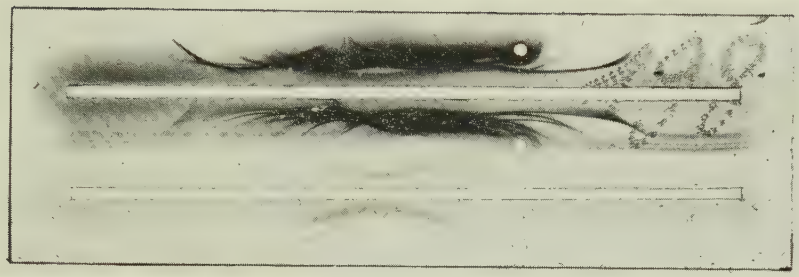


FIGURE 9

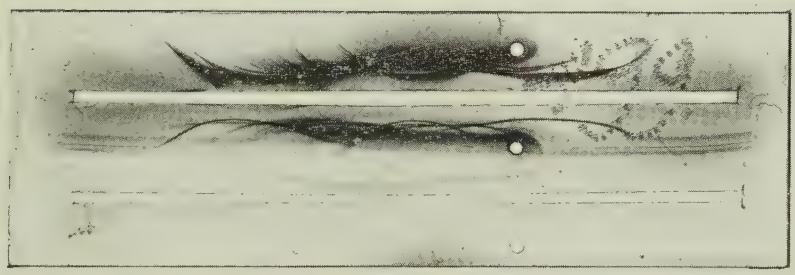


FIGURE 10

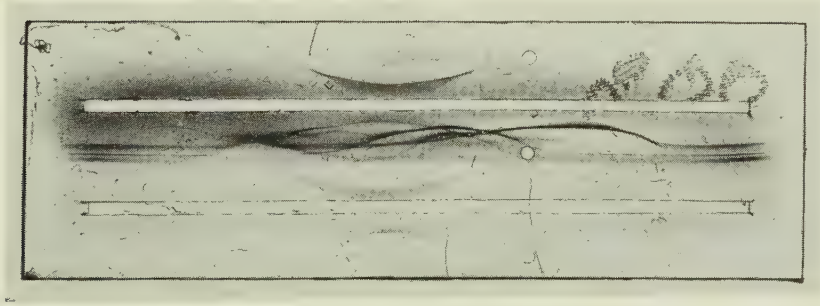


FIGURE 11

Si l'on obtient un arc avec le PPSB, cet arc est absent avec le réactif déprothrombiné et le sérum normal.

La figure (II) montre les résultats obtenus avec :

- la prothrombine chromatographiée 72 dans le réservoir supérieur ;
- la prothrombine brute 72 dans le réservoir central ;
- le plasma normal dans le réservoir inférieur.

Si la prothrombine chromatographiée ne donne qu'un seul arc de précipitation avec le sérum anti-sérum humain total, il n'en va pas de même pour la prothrombine brute. Cette dernière par contre ne donne plus qu'un arc avec les anticorps spécifiques anti-II.

La figure (I2) présente les résultats obtenus avec :

- le PPSB dans le réservoir supérieur ;
- la prothrombine chromatographiée 72 dans le réservoir central ;
- le réactif déprothrombiné dans le réservoir inférieur.

La figure (I3) présente les résultats obtenus avec :

- le plasma normal dans le réservoir supérieur ;
- le sérum normal dans le réservoir central ;
- la prothrombine chromatographiée 72 dans le réservoir inférieur.

../...

FIGURE 12

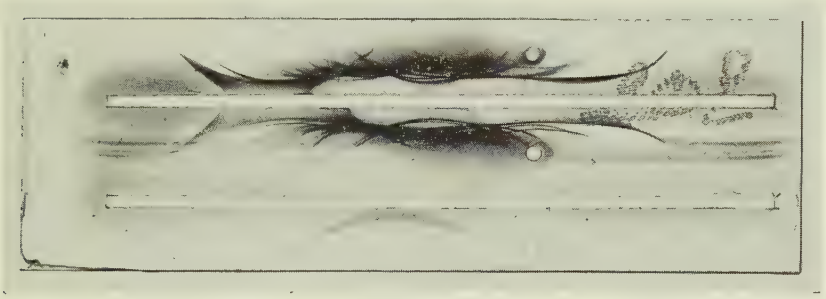


FIGURE 13

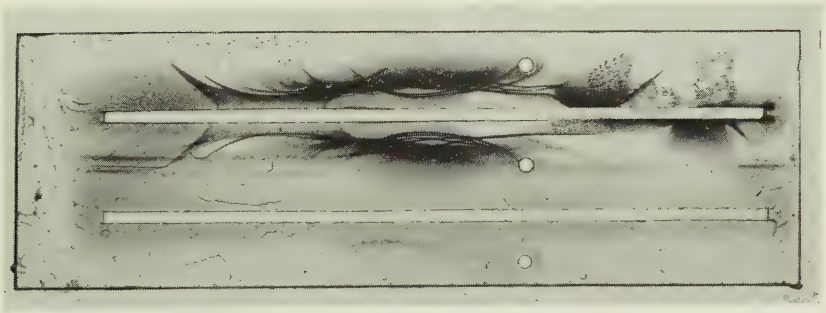


FIGURE 14

La figure (I4) présente les résultats obtenus avec :

- le sérum normal dans le réservoir supérieur ;
- le réactif déprothrombiné dans le réservoir central ;
- le plasma normal dans le réservoir inférieur.

Des résultats similaires ont été obtenus avec les autres anticorps anti-prothrombine.

On peut conclure de ces expériences que les anticorps anti-II sont capables de révéler un seul arc avec les antigènes contenant de la prothrombine et rien avec ceux dépourvus d'activité prothrombique. Cet arc est situé toujours à la même place, au niveau des alpha-2-globulines et semble être d'une importance variant avec le contenu en prothrombine de chaque préparation antigénique.

2°) Application au dosage de la prothrombine :

Le fait que cet arc semble décroitre en fonction du contenu en prothrombine de l'antigène étudié a conduit à un essai de dosage de la prothrombine par la technique d'immunodiffusion.

a) - Contre les anticorps n° 7, nous avons fait diffuser deux lots de prothrombine d'activité différente, marqués par I^{131} :

../...

- prothrombine brute lot 6I

- prothrombine chromatographiée lot P6I ;

L'activité de la première était environ deux fois supérieure à celle de la seconde. Nous avons obtenu un arc pour une dilution deux fois plus grande (fig. I5 et I6).

b) - L'anticorps n° 20 fut utilisé dans des expériences comparant à l'activité d'un plasma normal celle de différents réactifs.

L'activité antigénique de la prothrombine contenue dans ces différents réactifs a été déterminée par la plus forte dilution donnant un arc de précipitation visible comparée à la plus grande dilution du plasma normal donnant un arc. Nous avons pu ainsi comparer l'activité coagulante et l'activité antigénique de la prothrombine dans chacun de ces réactifs. (fig. I7).

	Activité coagulante	Activité antigénique
Plasma de déficit en prothrombine	I2 %(I)	I0 %(I)
Sérum d'hémophile	50 %	50 %
Plasma de sujet soumis à un traitement par la Warfarin	25 %	75 %

(I)- en % du plasma normal

- Tableau VII -

../...

FIGURE 15

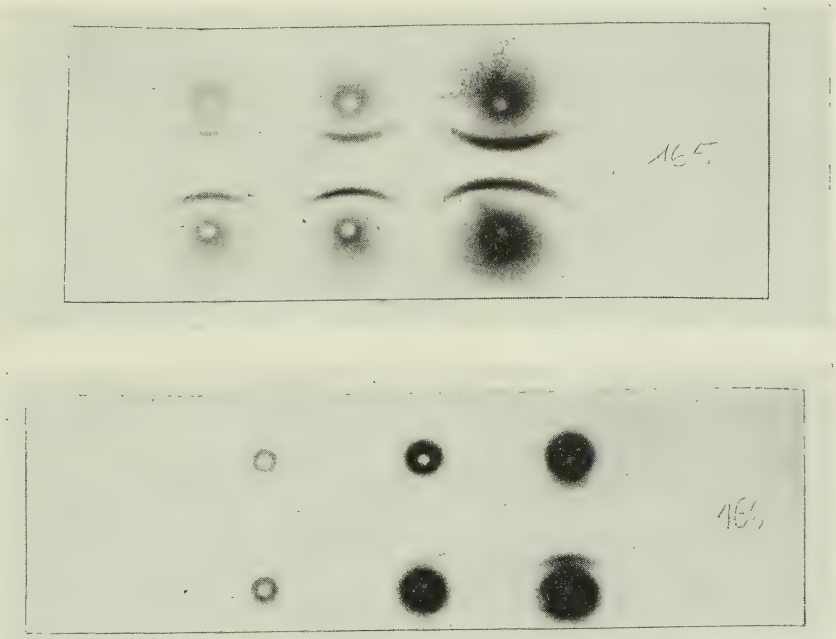


FIGURE 16

Il est difficile de tirer des conclusions d'un nombre d'expériences encore aussi restreint. Néanmoins il apparait que la seule discordance tient au plasma du sujet soumis aux anti-vitamine K. Sous réserve de confirmation, une telle observation serait en faveur de l'hypothèse émise par Hemker et coll. (56) de l'existence d'une "préprothrombine" chez ces malades.

Nous avons comparé l'activité d'un lot de prothrombine par rapport à celle d'un plasma normal. Bien que les dilutions de la prothrombine n'aient pas été poussées assez loin, on peut affirmer que ce lot est, antigéniquement parlant, au moins 10 fois plus actif que le plasma ce qui concorde avec l'activité coagulante. (fig. 18).

3°) Devenir de la prothrombine lors de son activation :

Une préparation de prothrombine marquée par I^{131} a été soumise à l'action d'une préparation de prothrombinase et de la trypsine. Cette action a été secondairement bloquée par le citrate dans le premier cas et par l'inhibiteur pancréatique dans le second. Une activité thrombique identique a été obtenue dans les deux mélanges qui ont été soumis à une immunoélectrophorèse contre des anti-corps anti-II (pool des anticorps 7, 8 et 9).

.../..

FIGURE 17

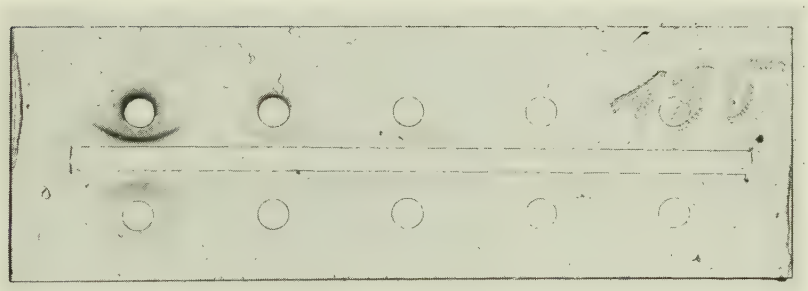


FIGURE 18

La concentration de thrombine obtenue était insuffisante pour donner un arc de précipitation même après radiophotographie. Un tel arc n'a été obtenu qu'avec la prothrombine du milieu. Cet arc diminue mais reste nettement visible au cours de l'activation par la prothrombinase alors qu'il disparait complètement au cours de l'action de la trypsine. (fig. 19 et 20).

II. - THROMBINE :

1°) Immunodiffusion :

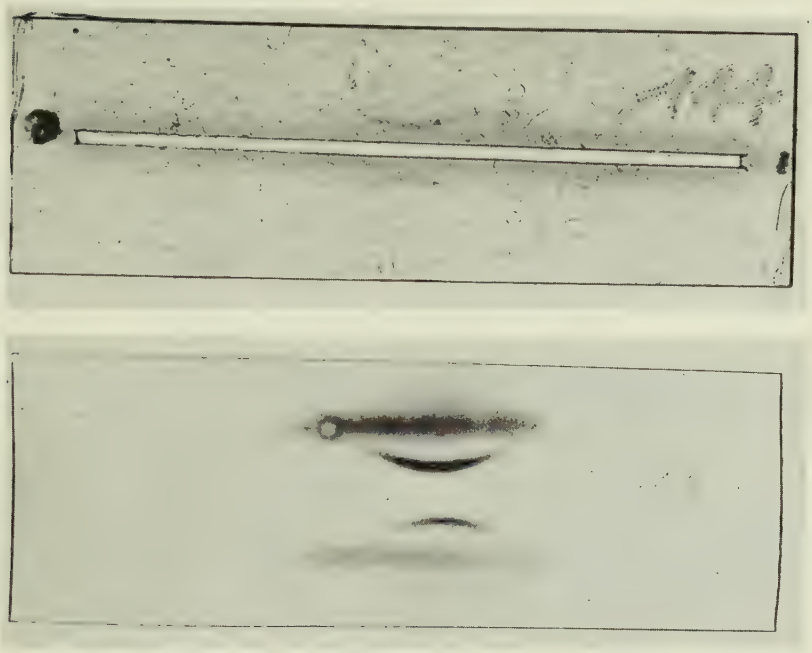
Les préparations de thrombine donnent un arc contre les anticorps anti-prothrombine (fig. 21). En fait ceci n'a pas de signification car selon toute vraisemblance la préparation de thrombine utilisée est contaminée par la prothrombine.

Néanmoins l'importance de l'arc, au regard de la faible contamination admissible, laisse penser que c'est en partie du moins la thrombine qui en est responsable.

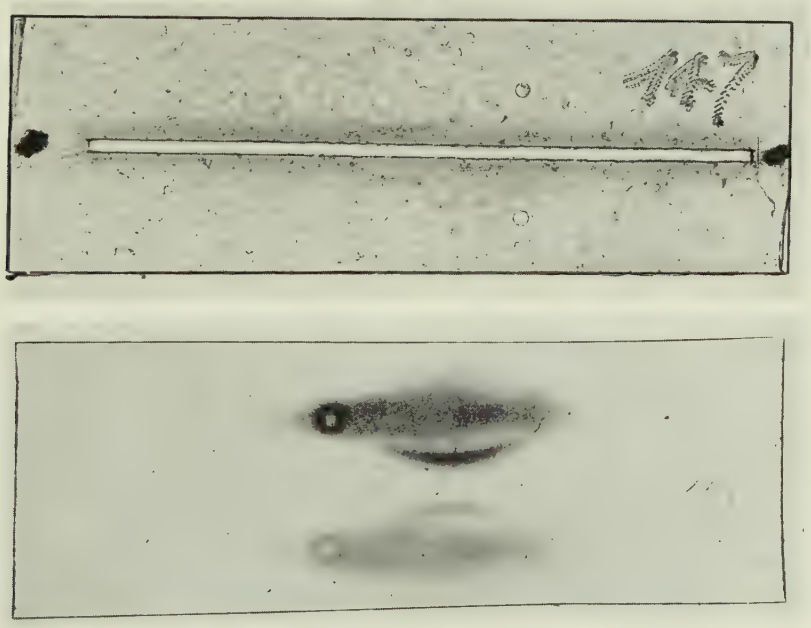
2°) Immunoélectrophorèse :

Contre l'anticorps anti-prothrombine n° 20, nous avons fait migrer une préparation de thrombine symétriquement à une préparation de prothrombine (lot 72) et à du plasma. La thrombine avait une activité de 280 U/ml (NIH), sa

.../...

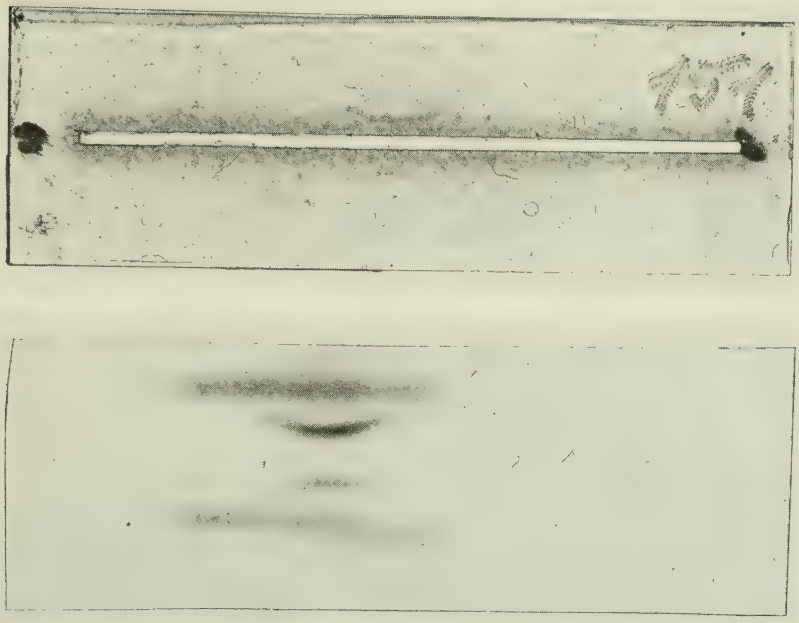


Temps 1

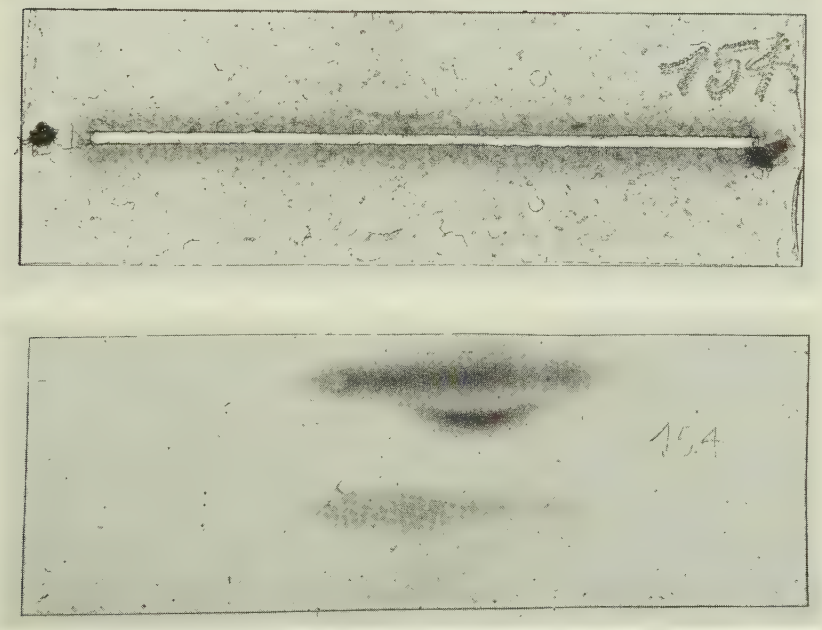


Temps 2

Figure 19



Temps 1



Temps 2

FIGURE 20

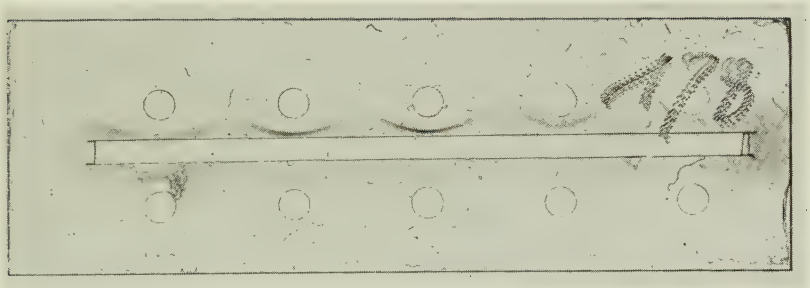


FIGURE 21

concentration en protéines étant de 10.8 mg/ml (fig. 22 et 23).

La thrombine donne un arc net et fin au regard d'une zone de migration plus lente que celle de la prothrombine. Sur la plaque(193) cet arc est en continuité avec un arc situé au regard de celui de la prothrombine (identité totale).

C. - Spécificité d'espèce des anticorps anti-prothrombine.

Les anticorps anti-prothrombine ont été testés vis à vis de préparations de thrombine de différentes espéces animales au regard de leur activité "coagulante" et en immunodiffusion. Le matériel employé fut :

- Thrombine humaine : activité 110 U/ml (NIH)
  concentration en protéines : 10.9 mg/ml
- Thrombine bovine : activité 180 U/ml (NIH)
  concentration en protéines : 4.80 mg/ml
- Thrombine équine : activité 110 U/ml (NIH)
  concentration en protéines : 6.50 mg/ml
- Thrombine aviaire : activité 30 U/ml (NIH)
  concentration en protéines : 11.30 mg/ml

.../...

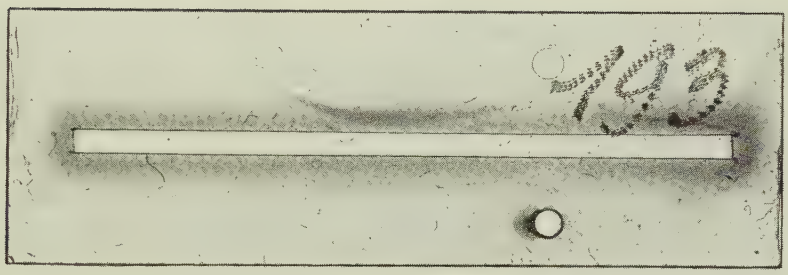


FIGURE 22

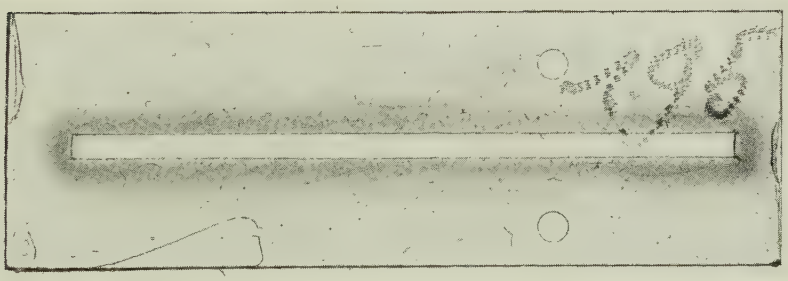


FIGURE 23

On n'observe aucune inhibition de la thrombine de poule; une inhibition faible de la thrombine bovine, plus nette de la thrombine équine mais très inférieure à l'inhibition de la thrombine humaine (Tableau VIII).

Le système employé était :

0.1 ml de thrombine

0.1 ml d'anticorps ou de gamma-G normales au 1:4

---

incubation 20' à 37°C

0.3 ml de fibrinogène à 0.2 %

En immunodiffusion, on obtient une ligne de précipitation nette avec la thrombine humaine et aucun arc avec les autres thrombines.

	gamma-G normales		Ac anti-II n° 21		activité anti-thrombique par ml
	temps	unités thrombiques	temps	unités thrombiques	
thrombine humaine 1:5	6"6		15"	7	6o U env.
thrombine équine 1:1o	1o"	12.5	13"8	7.9	18 U env.
thrombine bovine 1:16	1o"	1o.8	12"	8.9	8 U env.
thrombine aviaire 1:2	9"4	12.5	1o"	12.5	-

TABLEAU VIII

DISCUSSION.

Nous avons pu confirmer en immunisant le lapin contre diverses préparation de prothrombine, que cette protéine était fortement antigénique. Comme Barnhart et coll. (5) nous avons constaté qu'il suffisait de très faibles quantités d'antigène pour obtenir des anticorps puissants.

La possibilité d'épuiser ces immunsérums avec du sérum humain dépourvu de prothrombine mais dont le taux des facteurs VII, IX et X est normal, constitue un argument supplémentaire en faveur de l'absence de communauté antigénique entre la prothrombine et ces différents facteurs (I27).

Les anticorps anti-prothrombine permettent d'obtenir par les techniques d'immunoprécipitation en milieu gélifié, un arc unique contre tous les réactifs contenant de la prothrombine. En immunoélectrophorèse, cet arc est observé constamment dans la zone des alpha-2-globulines. Une expérience effectuée avec des anticorps de faible activité et une préparation de prothrombine marquée par un traceur radioactif nous a montré qu'il pouvait exister des arcs de précipitation très nets après

../...

autoradiographie mais parfaitement invisibles par les méthodes de coloration usuelles. Cette observation montre combien certaines constatations expérimentales dont les nôtres propres, sont soumises aux limites des méthodes employées.

L'importance de l'arc de précipitation visible est proportionnel à la quantité d'antigène opposé à une même concentration d'anticorps. Cela nous a permis de mesurer l'activité en prothrombine de divers réactifs. Dans ce nombre limité d'expériences, nous avons observé une bonne corrélation entre l'activité "coagulante" et l'activité antigénique, sauf dans le plasma d'un sujet soumis à un traitement par les anti-vitamine K. Dans un cas d'hypoprothrombinémie congénitale (56), la corrélation entre les deux méthodes de dosage est en faveur de l'existence d'un déficit quantitatif et non qualitatif et non qualitatif en prothrombine.

A l'activité précipitante des anticorps correspond une activité inhibitrice vis à vis des propriétés "coagulantes" de la prothrombine. Cette activité peut être mesurée avec une bonne précision. Nous avons obtenu des préparations d'anticorps capables de neutraliser volume à volume la quasi-totalité de la prothrombine contenue dans le plasma.

.../..

Les anticorps anti-prothrombine ont également une activité inhibitrice marquée vis à vis de la thrombine. Rapportée en unités, cette activité parait nettement moindre que l'activité anti-prothrombine. Cette observation est intéressante dans la mesure où l'unité de prothrombine est justement définie par le fait qu'elle peut générer une unité de thrombine qui, elle seule, est mesurable.

L'inhibition de la thrombine par les anticorps est extrêmement rapide ; nous avons même observé, dans nos conditions expérimentales, une activité de type immédiat ; néanmoins l'inhibition progresse dans le temps et n'est maximum qu'après un certain temps d'activation.

Par les techniques d'immunoprécipitation en milieu gélifié les anticorps anti-prothrombine donnent un arc de précipitation contre les préparations de thrombine humaine. Cette observation doit être discutée en fonction de la contamination probable des préparations de thrombine que nous avons utilisées par de la prothrombine résiduelle. Cependant en immunoélectrophorèse, l'arc de précipitation se dessine dans une zone plus lente que celui de la prothrombine, souvent prolongé d'ailleurs jusqu'à la zone des alpha-2-globulines ce qui est bien en faveur de la contamination

../...

par la prothrombine. Comme la migration électrophorétique de la thrombine est justement plus lente dans les mêmes conditions que celle de la prothrombine (la thrombine étant définie par son activité "coagulante") il parait probable que l'arc représente bien le précipité spécifique entre la thrombine et les anti-corps anti-prothrombine. Ici encore, à nombre d'unités égal, le précipité est moins important avec la thrombine qu'avec la prothrombine.

Dans les conditions expérimentales dans lesquelles nous nous sommes placés, nous n'avons obtenu aucun arc de précipitation en opposant aux anticorps anti-prothrombine humaine des thrombines de différentes espèces animales (boeuf, cheval et poule). Cependant nous avons observé une activité inhibitrice notable de l'action "coagulante" de la thrombine équine, bien moindre de la thrombine bovine et nulle de la thrombine aviaire. Ce fait tendrait à indiquer qu'il existe tout de même une certaine parenté antigénique entre la prothrombine humaine et celles de certains mammifères, beaucoup moins prononcée cependant que pour d'autres protéines plasmatiques telles que le fibrinogène par exemple.

.../..

ACTION DE LA STAPHYLOCOAGULASE SUR LA PROTHROMBINE.

On sait depuis Loeb (I903) (65) que la staphylocoagulase est capable de coaguler le sang. Smith et Hale (I944) (II6) ont montré que cette substance produite par le staphylocoque doré ne coagulait le fibrinogène qu'après interaction avec un facteur plasmatique, désigné du nom de coagulase-reacting factor (CRF) par Tager (I29).

De nombreux arguments plaident en faveur de l'identité entre la prothrombine (facteur II) et le CRF (25,95,I20). Cette hypothèse parait confirmée par des travaux récents (I2I).

Nous entendrons ici sous le nom de thrombine-coagulase, le produit de l'interaction de staphylocoagulase et d'une préparation de prothrombine. Ce produit est capable de coaguler le fibrinogène et d'hydrolyser le TAMe (Tosyl-Arginine-Methyl-ester) (I22).

../...

MATERIEL.

- Staphylocoagulase : Obtenue à partir de staphylocoques dorés secrétants. Culture de 4 à 6 jours en bouillon cervelle-coeur DIFCO. Centrifugation à haute vitesse suivie de passage sur filtre millipore. Après précipitation acide (HCl 3 N) à pH 3.8, le précipité est lavé en tampon acétate à pH 3.8 et dissout au I:20 du volume initial à pH 7.4-7.8.

Nous avons utilisé des staphylocoagulases de différentes souches :

- souche Tager (USA)
- souche IL25 (GB)
- souche Cometti (F)

- Thrombine-coagulase : produit de l'interaction de staphylocoagulase souche Tager sur une prothrombine brute. Après incubation d'une heure à 37°C, le mélange est précipité par l'acétone.

Le produit actif est extrait du précipité en tampon TRIS 0,15 M. Il est ensuite traité par la célite pour éliminer la biothrombine puis par le phosphate tricalcique pour éliminer la prothrombine résiduelle. Il est

../...

enfin lyophilisé.

Nous avons utilisé deux lots de thrombine-coagulase :

- lot du IC.OI.I966 : concentration en protéines : 2.9 g/l ; activité thrombique après lyophilisation dans le système :

0.4 ml de Fibrinogène à 0.2 %

0.I ml de thrombine-coagulase

à pH 7.6, le temps obtenu était de I2"6

-lot du I6.6.I966 : concentration en protéines : 2.8 g/l ; activité thrombique dans les mêmes conditions : I7"2.

- Fibrinogène bovin Kabi : utilisé car non contaminé par une activité CRF.

- Milieu cervelle-coeur DIFCO. Ce milieu ne contient pas de protéines humaines.

IMMUNSERUMS ANTI-THROMBINE-COAGULASE.

I°) Immunisation : trois lapins n° I, 2 et 3 furent immunisés à l'aide du lot du IC.I.66 par injections IM selon le schéma :

.../...

	Jour J	J + 7	J + I4
Thrombine-coagulase	0.5 ml	I.0 ml	2.0 ml
Sérum physiologique	I.5 ml	I.0 ml	-
Adjuvant de Freund complet	2.0 ml	2.0 ml	2.0 ml

Au jour J + 28, les lapins reçurent en IV, 2.0 ml de thrombine-coagulase diluée au I:8 en sérum physiologique et au jour J + 35, une deuxième injection IV des mêmes quantités.

Les lapins avaient alors reçu environ II.5 mg de protéines chacun. Les sérums furent recueillis par ponction carotidienne une semaine après la dernière injection IV.

2°) Activité antithrombique des immunsérums : Cette activité fut recherchée dans le système :

0.I ml d'immunsérum ou de tampon

0.2 ml de fibrinogène à 0.2 %

0.I ml de thrombine-coagulase au I:2

Les immunsérums avaient été au préalable oxalatés et absorbés par le phosphate tricalcique (5mg/ml).

Tampon	I8"
immunsérum n° I	33"
immunsérum n° 2	I8"5
immunsérum n° 3	I8"

.../...

Seul l'immunsérum n° I se révélait anti-thrombine-coagulase.

IMMUNSERUMS ANTI-STAPHYLOCOAGULASE.

I°) Immunisation : Trois lapins n° 4, 5 et 6 furent immunisés contre la staphylocoagulase souche Tager, lot n° 2 du 2I.9.65. Concentration en protéines : 3.8 g/l ; donnant en test de Tager (cf. infra) un temps de 26". L'immunisation fut conduite selon le schéma suivant par voie IM :

	Jour J	J + 7	J + I4
Staphylo-coagulase	0.5 ml	I.0 ml	2.0 ml
Sérum physiologique	I.5 ml	I.0 ml	-
Adjuvant de Freund complet	2.0 ml	2.0 ml	2.0 ml

Les lapins présentèrent dès la première injection des abcès aux points d'injection. Il ne fut pas retrouvé de staphylocoque doré au niveau de ces abcès. Le lapin n° 5 ne survécut pas. Les sérums n° 4 et 6 furent recueillis une semaine après la dernière injection. La quantité de protéines injectée à chaque lapin était d'environ I3 mg.

../...

2°) Activité anti-staphylocoagulase des immunsérums : fut recherchée après chauffage des immunsérums et d'un sérum normal témoin pendant 30' à 56°C, dans le système :

0.I ml de plasma humain normal

0.I ml de sérum immun ou témoin

0.I ml de staphylocoagulase

Les temps obtenus furent les suivants :

Sérum témoin	26"
Immunsérum n° 4	34"
Immunsérum n° 6	36"

EPUISEMENT ET CONCENTRATION DES ANTICORPS

I°) Epuisement : nous nous sommes servis pour épuiser l'immunsérum anti-thrombine-coagulase de sérum "déprothrombiné" employé pour épuiser les immunsérums anti-prothrombine. Les immunsérums anti-staphylocoagulase furent épuisés par leur propre milieu de culture. Le schéma d'épuisement fut identique à celui utilisé pour épuiser les immunsérums anti-prothrombine.

2°) Concentration des anticorps : processus identique à celui ayant servi à concentrer les anticorps anti-prothrombine.

../...

METHODES.

- Mesure de l'activité de la staphylocoagulase :

par le temps de Tager :

0.2 ml de plasma normal

0.2 ml de staphylocoagulase

Le temps de coagulation obtenu avec un plasma défini est inversement proportionnel à l'activité de la staphylocoagulase.

- Mesure de l'activité de la thrombine-coagulase :

identique à celle de la mesure de l'activité de la biothrombine (en utilisant du fibrinogène bovin).

../...

RESULTATS.

A. - Recherche de l'activité des anticorps en milieu gelifié (immunodiffusion).

Nous avons testé en immunodiffusion les anticorps anti-staphylocoagulase et anti-thrombine-coagulase contre divers antigènes.

Les anticorps anti-staphylocoagulase nous ont donné des lignes de précipitation contre :

- la staphylocoagulase
- la thrombine-coagulase.

Les anticorps anti-thrombine-coagulase nous ont donné des lignes de précipitation contre :

- la staphylocoagulase
- la thrombine-coagulase
- la biothrombine
- la prothrombine.

Les résultats de ces expériences n'ont cependant pas de signification car elles ont été conduites avec les immunsérums non absorbés.

../...

B. - Action des anticorps sur l'activité "coagulante" des divers antigènes.

I°) Anticorps anti-staphylocoagulase :

a) Action anti-staphylocoagulase : cette action fut recherchée vis à vis de staphylocoagulase souche Tager mais également vis à vis de staphylocoagulase de souche IL25 et Cometti, après une incubation de 30' à 37°C. (tableau IX).

	staphylo-coagulase Tager	staphylo-coagulase IL25	staphylo-coagulase Cometti
Sérum témoin	I6"	26"	I7"8
Anticorps n° 4	22"2	28"4	29"
Anticorps n° 6	67"6	33"4	II7"4

- Tableau IX -

Les anticorps n° 6 se sont révélés particulièrement puissants. Il n'y aurait pas de stricte spécificité de souche ; les anticorps antistaphylocoagulase souche Tager sont également anti-staphylocoagulase souche IL25 ou Cometti avec cependant des différences d'intensité dont la signification reste à évaluer.

.../..

b) Action anti-thrombine-coagulase : également à l'aide de thrombine-coagulase provenant de l'action sur la prothrombine de chacune des trois souches précédentes fut recherchée l'action anti-thrombine-coagulase des anticorps anti-staphylocoagulase (Tableau X).

	thrombine coagulase Tager	thrombine coagulase IL25	thrombine coagulase Cometti
Sérum témoin	45"6	52"6	4I"4
Anticorps n° 4	II4"	III"	II6"
Anticorps n° 6	>I8C"	57"4	>I8C"

- Tableau X -

Il apparait que les anticorps antistaphylocoagulase Tager sont capables d'inhiber l'action de la thrombine-coagulase sur le fibrinogène et cela quelle que soit la souche utilisée pour la préparation de celle-ci.

2°) Anticorps anti-thrombine-coagulase :

a) Action anti-thrombine-coagulase : l'action des anticorps n° I anti-thrombine-coagulase fut recherchée avant et après incubation (Tableau XI).

.../...

	sans incubation	incubation 30'-37°C
Tampon	20"	I8"
GammaG normales	20"	I8"
Anticorps n° I	27"5	> I0'

- Tableau XI -

Les anticorps se révèlent avoir une action immédiate sur l'activité de la thrombine-coagulase, action n'atteignant cependant son maximum qu'après un certain temps.

b) Action anti-staphylocoagulase : elle fut recherchée par l'inhibition par la staphylocoagulase de l'action des anticorps anti-thrombine-coagulase sur l'activité de la thrombine-coagulase (Tableau XII).

Anticorps anti-thrombine-coagulase + tampon	69"8
Anticorps anti-thrombine-coagulase + gamma-globulines normales	55"8
Anticorps anti-thrombine-coagulase + staphylocoagulase	36"4

- Tableau XII -

.../...

Ainsi l'activité spécifique des anticorps antithrombine coagulase est diminuée fortement par l'adjonction préalable à ceux-ci de staphylocoagulase. Donc les anticorps antithrombine-coagulase sont capablent de réagir avec la staphylocoagulase.

c)Action anti-biothrombine : comme pour l'action antithrombine-coagulase, elle fut recherchée avant et après incubation (Tableau XIII).

	Sans incubation	incubation 30'-37°C
Tampon	2I"	2I"
GammaG normales	22"	32"
Anticorps n° I	5'	> IO'

- Tableau XIII -

L'action des anticorps est ici encore immédiate et magnifiée par l'incubation.

3°) Anticorps anti-prothrombine :

Action sur la thrombine-coagulase :

cette action est nettement inférieure à celle des anticorps anti-thrombine-coagulase (Tableau XIV).

../...

	Sans incubation	Incubation 30' - 37°C
Tampon	20"	17"
gammaG anormales	20"	17"
anticorps n°20	21"	31"

- Tableau XIV -

C.- Variation de l'activité des anticorps en fonction du rapport antigène-anticorps.

Nous avons étudié les variations d'activité inhibitrice vis à vis de la thrombine-coagulase d'une même quantité d'anticorps anti-prothrombine, anti-thrombine-coagulase et anti-staphylocoagulase en fonction de la concentration de la thrombine-coagulase (Tableau XV)

../...

Thrombine coagulase U/ml	GammaG normales étalonnage	anticorps Temps	AntiTC titre anti-TC +	anticorps temps	AntiBC titre anti-TC +	Anticorps: temps	AntiII titre anti-TC +
85	-	-		-		I0"	55
42.5	-	I3"5	25	I2"5	23	I2"5	23
21.25	I2"	48"	I8	20"5	I3	I7"	I0
I0.6	I8"	107"		43"		28"	5
5.3	30"5	-		-		-	

+ Le titre est défini par le nombre d'unités de thrombine-coagulase neutralisées par I ml d'anticorps.

- Tableau XV -

Il apparait que l'activité des anticorps étudiés vis à vis de la thrombine-coagulase et particulièrement des anticorps anti-prothrombine varie de façon importante en fonction du rapport antigène-anticorps.

A l'opposé, l'activité inhibitrice des anticorps anti-thrombine-coagulase vis à vis de la biothrombine ne subit pas les mêmes variations (Tableau XVI).

concentrations de biothrombine U/ml	gamma-globulines normales (étalonnage)	anticorps anti-TC n° I	
		temps	titre
25	-	6"5	
I6.6	-	8"5	6.6 U
I2.5	-	I4"	8 U
I0	8"5	2I"	7.5 U
5	I4"5	2'	
2.5	20"5	-	
I.25	33"	-	

- Tableau XVI -

Cependant nous n'avons pas disposé au moment de l'expérience d'une biothrombine suffisamment active pour présenter à l'anticorps un antigène très concentré.

.../...

D.-Cinétique de l'action des anticorps vis à vis de la thrombine-coagulase.

Nous avons soumis une même quantité de thrombine-coagulase aux anticorps anti-prothrombine, antistaphylocoagulase et anti-thrombine-coagulase. Nous avons déterminé la variation de l'activité inhibitrice en fonction du temps d'incubation (figure 24).

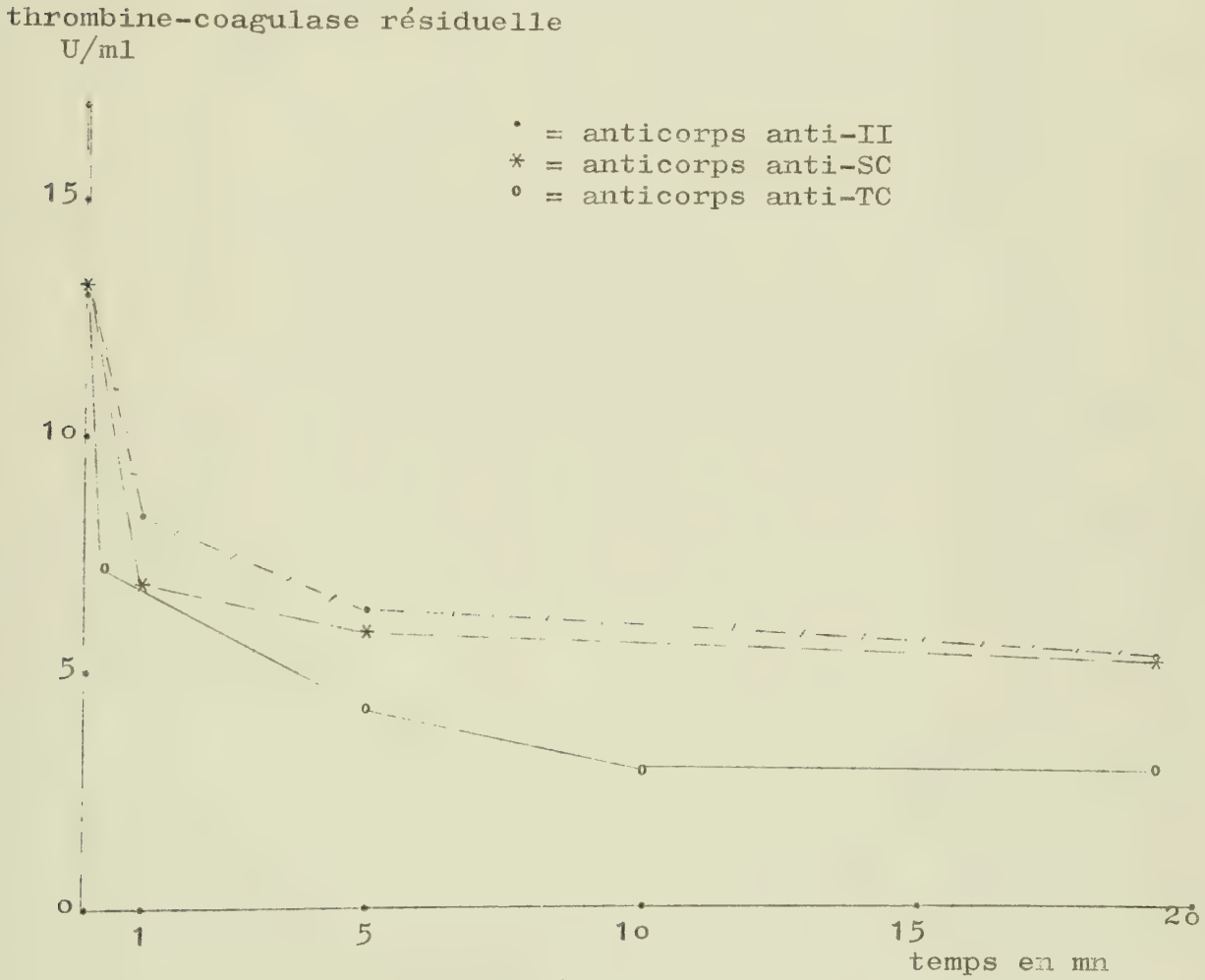


figure 24

Quel que soit l'anticorps, l'activité inhibitrice se développe rapidement mais demande un certain temps pour atteindre son maximum.

D I S C U S S I O N

Nous avons pu obtenir par immunisation du lapin des immun-sérums anti-staphylocoagulase et anti-thrombine-coagulase. La thrombine-coagulase avait été obtenue en faisant agir la staphylocoagulase sur une préparation de prothrombine purifiée. Dans nos conditions expérimentales, la thrombine-coagulase s'est montrée d'une antigénicité assez faible. Néanmoins des anticorps puissants ont pu être obtenus chez un animal.

Les anticorps anti-staphylocoagulase ont une activité inhibitrice non seulement vis-à vis de la staphylocoagulase mais également vis-à-vis de l'action de la thrombine-coagulase sur le fibrinogène. Ils n'ont par contre aucune activité vis-à-vis de la biothrombine (thrombine physiologique).

Les anticorps anti-thrombine coagulase ont une activité non seulement vis-à-vis de la thrombine-coagulase mais également vis-à-vis de la biothrombine. L'activité spécifique des anticorps anti-thrombine-coagulase est fortement diminuée lorsqu'ils sont préalablement absorbés par la staphylocoagulase.

.../..

Les anticorps anti-prothrombine ont une activité anti-thrombine- coagulase comme une activité anti-biothrombine.

Ces résultats montrent que, selon toute vraisemblance, la thrombine-coagulase est formée d'un complexe comportant à la fois des motifs antigéniques de la prothrombine et de la staphylocoagulase.Ceci constitue en outre un argument supplémentaire important en faveur de l'identité entre la prothrombine et le co-facteur de la staphylocoagulase (C.A.F. de Tager).

Il est impossible de comparer quantitativement les activités anti-biothrombine et anti-thrombine-coagulase des anticorps anti-thrombine-coagulase et des anticorps anti-prothrombine. En effet, les conditions de l'obtention de ces deux types d'anticorps ne sont pas les mêmes. Néanmoins, l'étude de la cinétique de l'action vis à vis de la thrombine-coagulase des anticorps anti-staphylocoagulase, anti-thrombine-coagulase et anti-prothrombine nous a montré que, dans nos conditions expérimentales, l'activité inhibitrice de ces divers anticorps était certes rapide, mais nettement progressive. D'autre part, l'importance de cette activité inhibitrice nous a paru varier considérablement en fonction du rapport antigène-anticorps. Ces observations sont d'interprétation difficile mais semblent prouver la nature complexe de l'antigène thrombine-coagulase.

C O N C L U S I O N S.

Les méthodes immunologiques apportent à l'étude des protéines plasmatiques de la coagulation des possibilités d'approche que n'autorise pas l'utilisation des seules techniques de coagulation. Au cours de ces dix dernières années, ces méthodes ont fait l'objet de quelques travaux appliqués aux facteurs II, VII, VIII, IX, XIII et surtout au fibrinogène. Les faits les plus marquants concernent la structure de la molécule de fibrinogène.

Nous avons pu obtenir des anticorps anti-prothrombine humaine spécifiques par immunisation de l'animal, avec des préparations de prothrombine purifiées et absorption des immunsérums. L'activité inhibitrice de ces anticorps vis à vis de l'activité coagulante de la prothrombine a été déterminée. Par les techniques de précipitation en milieu gélifié la prothrombine a pu être caractérisée et son activité antigénique mesurée. Les résultats du dosage de la prothrombine par les méthodes de coagulation et d'immunoprécipitation ont été comparés. Dans un cas de déficit congénital en prothrombine, ils se sont montrés exactement superposables.

../...

Les anticorps anti-prothrombine inhibent l'activité coagulante de la thrombine et forment avec elle un précipité spécifique. Certains des motifs antigéniques de la prothrombine au moins sont conservés lorsque la molécule se transforme en thrombine. Les résultats que nous avons obtenus confirment que, malgré une parenté étroite à plusieurs titres, il n'existe pas de communauté antigénique entre la prothrombine et les facteurs VII, IX et X.

La méthode immunologique a été appliquée à l'étude du support de l'activité thrombique (thrombine-coagulase) qui apparait après action de la staphylocoagulase sur la prothrombine. Les anticorps spécifiques anti-staphylocoagulase et anti-thrombine-coagulase ont été obtenus chez l'animal et leur activité comparée à celle des anticorps anti-prothrombine. Les résultats de cette étude démontrent que la thrombine-coagulase comporte à la fois des motifs antigéniques de la prothrombine et de la staphylocoagulase.

+ +
+

B I B L I O G R A P H I E .

1- ADELSON (E), RHEINGOLD (J.J.), PARKER (O.), STEINER (M.) KIRBY (J.C.)
The survival of factor VIII (antihemophilic globulin) and factor IX (plasma thromboplastin component) in normal humans .
- J. Clin Invest., 42, 1040, 1963.

2- ANDERSON (G.F.), BARNHART (M.I.)
Intracellular localization of prothrombine.
- Proc. Soc. Exp. Bio. Med. , 116, 1, 1964.

3- ANDERSON (G.F.), BARNHART (M.I.)
Prothrombin synthesis in the dog.
- Amer. J. Physiol. 206, 5, 929, 1964.

4- BARNHART (M.I.)
Cellular Fibrinogen.
- in suppl. 13 ad Thromb. Diath. Haemorrh., 157, 1963

5- BARNHART (M.I.), ANDERSON (G.F.), BAKER(W.J.)
Immunochemical studies on proteins important in blood coagulation.
- Thromb. Diath. Haemorrh., VIII, 1/2, 21, 1962.

6- BARNHART (M.I.) and FORMAN (W.B.)
The cellular localization of fibrinogen as revealed by the fluorescent antibody technique
- Vox Sang, 8, 461, 1963

7- BECK (E.A.), CHARACHE (P.),and JACKSON (D.P.)
A new inherited coagulation disorder caused by an abnormal fibrinogen ("Fibrinogen Baltimore")
- Nature (London),208, 143, 1965.

../....

8- BERGLUND (G.)
Immunoélectrophoretic studies of fibrinogen plasmin and lytic products of fibrinogen and fibrin.
-Int. Arch. Allergy, 21, 193, 1962

9- BERGLUND (G.)
Production of immune sera to anti-hemophilic factor preparation in rabbits tolerant to fibrinogen.
-Int.Arch. Allerg. , 23, 1, 1963

10- BERGLUND (G.) and BLOMBÄCK (B.)
On an antibody against human fibrinopeptide B.
- in: Genetics and the interaction of blood clotting factors, Thromb. Diath. Haemorrh., suppl.17 ad vol. 13, 265, 1965

11- BIGGS (R.), MAC FARLANE (R.G.)
Human blood coagulation and its disorders.
- Blackwell Scienfif. Publications Oxford 3rd Edition 1962

12- BOYD (W.C.)
Fundamental of immunology.
- 2nd Edition, 1956, Interscience Publishers, New York

13- BOYDEN (S.V.)
The adsorption of proteins on erythrocytes treated with tannic acid and subsequent hemagglutination by antiprotein sera.
- J. Exp. Med. 93, 107, 1951

14-BRECKENRIDGE (R.T.), RATNOFF (O.D.)
Studies on the nature of the circulating anticoagulant directed agains$_t$ antihemopholic factor: with notes on an assay for antihemophilic factor.
- Blood, 20, 137, 1962

../....

15- BRÖNNIMANN (R)
Kongenitale Afibrinogenämic Bildung eines specifischen Antikorpers (antifibrinogen) nach Bluttransfusionen.
- Acta Haemat., 11, 4o, 1954

16- CAEN (J), CASTALDI (P), INCEMAN (S)
Le rôle du fibrinogène dans l'hémostase primaire.
- Nouv. Rev. Franç. Hemat., 5, 2, 327, 1965

17- CAMPBELL (D.H), LUESCHER (E), LERMAN (L.S)
Immunologic adsorbents. I.-Isolation of antibody by means of a cellulose-protein antigen.
- Proc. Nat. Acad. Sc., 37, 575, 1951

18- CHADWICK (C.S), McENTEGART (M.G), NAIRN (R.C)
Fluorescent protein tracers a simple alternative to fluorescein.
- Immunology, Oxf., 1, 315, 1958

19- COLOMBANI (J), TERRIER (E)
Immunological investigation of a Christmas factor inhibitor by means of Boyden's technique.
- Nature (London), 196, 1111, 1962

2o- COONS (A.H), KAPLAN (M.H)
Localization of antigen in tissue cells. II.- Improvements in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody.
- J. Exp. Med., 91, 1, 1, 195o

21- CRADDOCK (C.G.Jr), LAWRENCE (J.S)
Hemophilia. A report of the mechanism of the development and action of an anticoagulant in two cases.
- Blood, 2, 5o5, 1947

../...

22- CROWLE (A.J)
in : Immunodiffusion
- New York, Academic, 1961

23- DAY (E.D), PLANINSEK (J.A), PRESSMAN (D)
Localization of radioiodinated rat fibrinogen in the lumphy rat lymphosarcoma and in other transportable rat tumors.
- J. Natl. Cancer Invest., 22, 413, 1959

24- DORMONT (J), ROUSSEL-LE GUEN (J), DURAFFOURD (P), CROSNIER (J)
Anticoagulant circulant inhibiteur du facteur anti-hémophilique A, découvert dans les suites d'accidents de "toxémie gravidique". Evolution vers la guérison.
- Rev. Fr. Et. Clin. Biol., 6, 1o, 1o14, 1961

25- DUTHIE (E.S), LORENZ (L.L)
Staphylococcal coagulase : the nature of plasma activator in the clotting process.
- Nature (London), 165, 729, 195o

26- EGEBERG (O)
Acquired circulating anticoagulant in classical hemophilia.
- Scand. J. Clin. Lab. Invest., 13, 535, 1961

27- FANTL (P), SAWERS (R.J), MARR (A.G)
Investigation of a haemorrhagic disease due to a beta-prothromboplastin deficiency complicated by a specific inhibitor of thromboplastin formation.
- Australasian Ann. Med., 5, 163, 1956

../...

28- von FELTEN (A), DUCKERT (F), FRICK (P)
Asymptomatic congenital disturbance of aggregation of fibrin monomers.
- C. R. X° Cong. Soc. Europ. Hemat., Strasbourg, 1965 (à paraître)

29- FERREIRA (H.C), MURAT (L.G)
An immunological method for demonstrating fibrin degradation products in serum and its use in the diagnosis of fibrinolytic states.
- Brit. J. Haemat., 9, 299, 1963

3o- FERRI (R.G), FERREIRA (H.C)
Immunochemical studies of the circulating products of fibrinogenolysis in certain pathological conditions.
- Vox Sang., 8, 356, 1963

31- FISCHER (S), FLETCHER (A.P), ALKJAERSIG (N), SHERRY (S)
Fibrinogenolysis in vivo : identification, occurence and characterization in man.
- J. Clin. Invest., 42, 931, 1963

32- FOX (F.J.Jr), WIDE (L), KILLANDER (J), GEMZELL (C)
Determination of fibrinogen and fibrinolysis products in human plasma by an immunochemical method.
- Scand. J. Clin. Lab. Invest., 17; 341, 1965

33- GARNER (R.D)
The fibrinolytic enzyme of hemolytic streptococci.
- J. Biol. Chem., 1o9, 36, 1935

../...

34- GASPARY (E.A)
The immunological properties of a purified human fibrinogen.
- Biochem. J., 62, 13, 1956

35- GITLIN (D)
Immunochemistry and its relationship to atherosclerosis. Connective tissue, thrombosis and atherosclerosis.
- I.H. PAGE, edit. Acad. Press, New York,1959,p285

36- GITLIN (D), BORGES (W.H)
Studies on the metabolism of fibrinogen in two patients with congenital afibrinogenemia.
- Blood, 8, 679, 1953

37- GITLIN (D), LANDING (B.H), WIPPLE (A)
The localization of homologous plasma proteins in the tissues of young human beings as demonstrated with fluorescent antibodies.
- J. Exp. Med., 97, 163, 1953

38- GLEYE (M), SANDOR (G)
Etude immunologique des liquides extravasculaires d'origine non sécrétoire.
- Ann. Inst. Pasteur (Paris), 1o9,suppl. au n°5, 24, 1965

39- GOCKER (M), YUNIS (E)
Fibrinogen as part of platelet structure.
- Nature (London), 2oo, 59o, 1963

40- GOUDEMAND (M),FOUCAUT (M),HUTIN (A),PARQUET-GERNEZ (A)
Les anticoagulants circulants anti-facteur VIII au cours de l'hémophilie A.
- Nouv. Rev. Franç. Hemat., 3, 7o3, 1963

../...

41- GRABAR (P), WILLIAMS (C.A)
Méthode permettant l'étude conjuguée des propriétés électrophorétiques et immunochimiques d' un mélange de protéines. Application au sérum sanguin.
- Biochim. Biophys. Acta (Amst.), 1o, 193, 1953

42- GURWICH (A.E), KUZOVLEVA (O.B), TUMANOVA (A.E)
Production of protein-cellulose complexes (immunosorbents) in the form of suspensions able to bind great amounts of antibodies.
- Biokhimiia, 26, 8o3, 1961

43- GURWICH (A.E), DRIZLIKH (G.I)
Use of antibodies on an insoluble support for specific detection of radioactive antigens.
- Nature (London), 2o3, 648, 1964

44- HALICK (P), SEEGERS (W.H)
Antigenic properties of purified bovine prothrombin.
- Am. J. Physiol., 187, 1o3, 1956

45- HALL (C.E), SLAYTER (H.S)
The fibrinogen molecule : its size, shape and mode of polymerization.
- J. Biophys. Biochem. Cytol., 5, 11, 1959

46- HAMPTON (J.W), BIRD (R.M), HAMMARSTEN (D.M)
Defective fibrinase activity in two brothers.
- J. Lab. Clin. Med., 65, 3, 469, 1965

47- HARDISTY (R.M)
A naturally occuring inhibitor of Christmas factor (factor IX).
-- Thromb. Diath. Haemorrh., 8, 1/2, 67, 1962

48- HARDISTY (R.M), PINNIGER (J.L)
Congenital afibrinogenemia : further observations on the blood coagulation mechanism.
- Brit. J. Haemat., 2, 139, 1956

49- HEIDELBERGER (M), KENDALL (F.E)
A quantitative theory of the precipitation reaction.
- J. Exp. Med., 67, 181, 1938

5o- HEMKER (H.C),VELTKAMP (J.J),HENSEN (A),LOELIGER (E.A)
Nature of prothrombin synthesis. Preprothrombinaemia in vit. K-deficiency.
- Nature (London), 2oo, 589, 1963

5o-a- HEMKER (H.C), FEKKES (N), HENSEN (A), SCHRIJVER (H), LOELIGER (E.A)
Quantitation of circulating fibrinogen breakdown products in intravascular clotting.
- in : suppl. 2o ad Thromb. Diath. Haemorrh., 227, 1966

51- HITZIG (W.H), WERDER (E)
Kongenitale Afibrinogenämie.
- in : Protides of the Biological Fluids, 10th colloquium, Elsevier, edit., 193, 1963

52- HUNTER (W.M), GREENWOOD (F.C)
Preparation of iodine-131 labelled human growth hormone of high specific activity.
- Nature (London), 194, 495, 1962

53- JABLONOWITZ (J)
Alteration in the immunological specificity of fibrinogen by the action of fibrinolysin of the hemolytic streptococcus.
- Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 37, 548, 1937

../...

54- JAMIESON (G.A), PERT (J.H)
Studies on the digestion of human fibrinogen with plasmin.
- Vox Sang., 8, 46, 1963

55- JOSSO (F)
Espaces de diffusion et métabolisme des facteurs antihémophiliques (facteurs VIII et IX). Incidences thérapeutiques.
- C. R. du VI° Cong. Nat. de Transfusion Sanguine, Tours, 1966 (sous presse)

56- JOSSO (F), PROU-WARTELLE (O), SOULIER (J.P)
Etude d'un cas d'hypoprothrombinémie congénitale.
- Nouv. Rev. Franç. Hémat., 2, 647, 1962

57- KABAT (E.A), MAYER (M.M)
Experimental immunochemistry.
- 2nd edit., Ch.C. Thomas, Springfield, Illinois, 1961

58- KOLLER (F), LOELIGER (E.A), DUCKERT (F)
Le facteur II. Sa fonction dans la coagulation; son importance clinique.
- Rev. Hemat., 7, 156, 1952

59- LAPRESLE (C)
Etude de la dégradation de la sérum-albumine humaine par un extrait de rate de lapin.
- Ann. Inst. Pasteur (Paris), 89, 654, 1955

6o- LARRIEU (M.J), MARDER (V.J), INCEMAN (S)
Effects of fibrinogen degradation products on platelets and coagulation.
- in : suppl. 2o ad Thromb. Diath. Haemorrh., 215 1966. (Diffuse Intravascular Clotting)

../...

61- LEITNER (A), BIDWELL (E), DIKE (G.W.R)
An antihemophilic globulin (factor VIII) inhibitor : purification, characterization and reaction kinetics.
- Brit. J. Haemat., 9, 245, 1963

62- LEWIS (J.H), DIDISHEIM (P)
Production of antihuman PTC and antihuman proconvertin in rabbits.
- Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 93, 429, 1956

63- LEWIS (J.H), FERGUSON (J.H), ARENDS (T)
Haemorrhagic disease with circulating inhibitor of blood clotting : anti-AHF and anti-PTC in eight cases.
- Blood, 11, 846, 1956

64- LEWIS (J.H), WILSON (J.H)
Fibrinogen breakdown products.
- Am. J. Physiol., 2o7, 5, 1o53, 1964

65- LOEB (L)
The influence of certain bacteria on the coagulation of the blood.
- J. Med. Res., 1o, 4o7, 19o3

66- LOEWI (A.G), DUNATHAN (K), KRIEL (R), WOLFINGER (H.L.Jr)
Fibrinase. I- Purification of substrate and enzyme.
- J. Biol. Chem., 236, 1o, 2625, 1965

67- LOPACIUK (S), NALECZYNSKA (A), CZAJA (H), WALEWSKA (I), PAWELSKI (S)
Circulating anticoagulant against factor VIII coexistent with some immunological reactions in a female.
- Thromb. Diath. Haemorrh., 11, 3/4, 444, 1964

../...

68- LORAND (L), JACOBSEN (A)
Studies on the polymerization of fibrin. The role of the globulin : fibrin stabilizing factor.
- J. Biol. Chem., 23o, 421, 1958

69- Mac LESTER (W.D), WAGNER (R.H)
Antibody to antihemophilic factor and its lack of reaction with hemophilic plasma.
- Am. J. Physiol., 2o8, 3, 499, 1965

7o- Mac LESTER (W.D), ROBERTS (H.R), WAGNER (R.H)
Use of an immunosorbent technique in the study of a PTC inhibitor : a new method for the investigation of blood coagulation.
- J. Lab. Clin. Med., 66, 682, 1965

71- MARRACK (J.R)
The chemistry of antigens and antibodies in Great Britain.
- Med. Research Council, Special Rep., series n°23o 1938

72- MENACH2 (D)
Constitutional and familial abnormal fibrinogen.
- in : Fibrinogen and Fibrin. Suppl. 13 ad Thromb. Diath. Haemorrh., 1964, p.173

73- MERSKEY (C), KLEINER (G.J), JOHNSON (A.J)
Quantitative estimation of split products of fibrinogen in human serum; relation to diagnosis and treatment.
- Blood, 28, 1, 1, 1966

../...

74- MICHAEL (S.E), TUNNAH (G.W)
The purification of factor VIII (antihaemophilic globulin). II- Further purification and some properties of factor VIII.
- Brit. J. Haemat., 12, 2, 115, 1966.

75- NACHMAN (R.L)
Immunologic studies of platelet protein.
- Blood, 25, 5, 703, 1965

76- NAIRN (R.C)
Fluorescent protein tracing.
- Edimburgh, Livingstone, 1962

77- NIEWIAROWSKI (S), KOVALSKI (E)
Antithrombin formation during proteolysis of fibrinogen.
- Trans. 6th Cong. Europ. Soc. Hemat., Copenhagen 1957

78- NILEHN (J.E), NILSSON (I.M)
Demonstration of fibrinolytic split products in human serum by an immunological method in spontaneous and induced fibrinolytic states.
- Scand. J. Haemat., 1, 313, 1964

79- NUSSENZWEIG (V), SELIGMANN (M)
Analyse par des méthodes immunochimiques de la dégradation par la plasmine du fibrinogène humain et de la fibrine, à différents stades.
- Rev. Hémat., 15, 451, 1960

80- NUSSENZWEIG (V), SELIGMANN (M), GRABAR (P)
Les produits de dégradation du fibrinogène humain par la plasmine. II- Etude immunologique : mise en évidence d'anticorps anti-fibrinogène natif possédant des spécificités différentes.
- Ann. Inst. Pasteur (Paris), 1oo, 49o, 1961

81- NUSSENZWEIG (V), de SOUZA (E.A)
Cross reaction studies in a protein-antiprotein system. The immunochemical relationship between two isolated components of digested human fibrinogen with bovine fibrinogen.
- Int. Arch. Allergy, 21, 294, 1962

82- OUCHTERLONY (Ö)
Antigen-antibody reactions in gel
- Arkiv Kemi Miner. Geol., 26B, 1, 1948

83- OUCHTERLONY (Ö)
Diffusion-in-gel methods for immunological analysis.
- in : Progress in allergy, vol.6, Karger, Basel, 1962, p. 3o

84- OUDIN (J)
L'analyse immunologique par la méthode des gels moyens et techniques d'identification des antigènes.
- Ann. Inst. Pasteur (Paris), 89, 531, 1955

85- OWREN (P.A)
A quantitative one-stage method for the assay of prothrombin.
- Scand. J. Clin. Lab. Invest., 1, 81, 1949

../...

86- PIPER (W), SCHREIER (M.H)
Über den immunologischen Nachweis von Faktor VIII. Protein im Bluterplasma und seine Bedeutung für das Verständnis des Hämophilie A.
- Thromb. Diath. Haemorrh., 11, 3/4, 423, 1964

87- POOL (J.G), SHANNON (A.E)
Production of high-potency concentrates of anti-hemophilic globulin in a closed-bag system. Assay in vitro and in vivo.
- New England J. Med., 273, 27, 1443, 1965

88- PRYDZ (H)
Studies on proconvertin. I- Purification.
- Scand. J. Clin. Lab. Invest., 15, 5, 45o, 1963

89- PRYDZ (H)
Studies on proconvertin. II- Further purification.
- Scand. J. Clin. Lab. Invest., 16, 1, 1o1, 1964

9o- PRYDZ (H)
Studies on proconvertin. VI- The production in rabbits of an antiserum against factor VII.
- Scand. J. Clin. Lab. Invest., 17, 1, 66, 1965

91- PRYDZ (H), FOSSEN (R.A)
Studies on proconvertin. VIII- The species specificity of factor VII.
- Scand. J. Clin. Lab. Invest., 17, 3, 218, 1965

92- QUICK (A.J), HUSSEY (C.V), GEPPERT (M)
Prothrombin : analytical and clinical aspects.
- Am. J. Med. Sci., 246, 517, 1963

../...

93- RICHARDS (M.D), SPAET (T.H)
Immunization of rabbits against human anti-hemophilic factor (AHF).
- Blood, 11, 5, 473, 1956

94- RIGGS (J.L), SELWALD (R.J), BURCKHALTER (J.H), DOWNS (C.M), METCALF (T.G)
Isothiocyanate compounds as fluorescent labelling agents for immune serum.
- Am. J. Pathol., 34, 1081, 1958

95- RUBINSTEIN (H.M)
Studies on the mechanism of action of staphylocoagulase.
- Brit. J. Haemat., 4, 326, 1958

96- SALMON (J), BOUNAMEAUX (Y)
Etude des antigènes plaquettaires et en particulier du fibrinogène.
- Thromb. Diath. Haemorrh., 2, 93, 1958

97- SALMON (J)
Etude immunochimique du fibrinogène et de ses dérivés.
- Clin. Chim. Acta, 4, 767, 1959

98- SALMON (J)
Etude immunochimique de la fibrinolyse et de la fibrinogénolyse.
- in : Protides of the Biological Fluids, Elsevier, édit., Amsterdam, 1962

99- SALMON (J)
Fibrinolyse et pathologie vasculaire.
- Arscia, édit., Bruxelles, 1964

1oo- SCHEIDEGGER (J.J)
Une microméthode de l'immunoélectrophorèse
- Int. Arch. Allergy, 7, 1o3, 1955

1o1- SCHWICK (G), SCHULTZE (H.E)
Immunchemische Untersuchungen mit Prothrombin und Thrombin.
- Clin. Chim. Acta, 4, 26, 1959

1o2- SCHWICK (G)
Immunochemistry of fibrinogen.
- Fibrinogen and Fibrin; in : suppl. 13 ad Thromb. Diath. Haemorrh., 85, 1964

1o3- SCHWICK (G),KRANZ (T),SCHMIDTBERGER (R),STORIKO (K)
Zur Immunologie des Fibrinogens und seiner Spalprodukte.
- Behringwerk-Mitteilungen, 43, 213, 1964

1o4- SCOTT BLAIR (G.W)
Biological aspects of occlusive vascular disease.
- University Press, edit., Cambridge, 1964,p. 245

1o5- SEEGERS (W.H)
The purification of prothrombin.
- Rec. Chem. Progr.,Kresge-Hooker Sci. Lib., 13, 143, 1952

1o6- SEEGERS (W.H),COLE (E.R),HARRISON (C.R),MARCINIAK (E)
Purification and some properties of autoprothrombin C.
- Canad. J. Biochem. Physiol., 41, 1o47, 1963

../...

107- SELIGMANN (M), GOUDEMAND (M), JANIN (A), BERNARD (J), GRABAR (P)
Etudes immunochimiques sur la présence de fibrinogène dans les extraits de plaquettes humaines lavées et dans certains extraits leucocytaires.
- Rev. Hémat., 12, 302, 1957

108- SELIGMANN (M)
Possibilité d'étude immunochimique de la fibrinolyse.
- Rev. Franç. Et. Clin. Biol., 3 1073, 1958

109- SELIGMANN (M), NUSSENZWEIG (V)
Etude immunochimique de la fibrinolyse.
- Rapport au VIII° Cong. Europ. Hémat., Vienne, 1961, Karger, edit., Dâle, 1962, p. 210

110- SELIGMANN (M), MARDER (V)
Application des techniques immunochimiques à l'étude du fibrinogène et de ses produits de dégradation par la plasmine.
- Nouv. Rev. Franç. Hémat., 5, 2, 345, 1965

111- SELIGMANN (M)
Agglutination des particules de latex recouvertes de serum anti-fibrinogène
- à paraître

112- SHAEFFER (J.R)
Interference in localization of I 131 fibrinogen in rat tumors by anticoagulants.
- Am. J. Physiol., 206, 573, 1964

113- SHANBERGE (J.N), GORE (I)
Studies on the immunologic and physiologic activities of antihemophilic factor (AHF).
- J. Lab. Clin. Med., 50, 954, 1957

../...

114- SINGER (S.J), SCHICK (A.F)
The properties of specific stains for electron microscopy prepared by the conjugation of antibody molecules with ferritin.
- J. Biophys. Biochem. Cytol., 9, 519, 1961

115- SISE (H.S),GAUTHIER (J),DESFORGES (J),BECKER (R)
Spontaneous circulating anticoagulant (anti-factor VIII). Case report and review of the litterature.
- Am. J. Med., 32, 964, 1962

116- SMITH (W), HALE (J.H)
Nature and mode of action of staphylococcus coagulase.
-Brit. J. Exp. Path., 25, 1o1, 1944

117- SOKAL (G)
Etude morphologique des plaquettes sanguines et de la métamorphose visqueuse au moyen d'antisérums fluorescents anti-fibrinogène et anti-plaquettes.
- Acta Haemat., 28, 313, 1962

118- SOULIER (J.P),BLATRIX (C),PROU-WARTELLE (O),VIGNAL (A)
Préparation d'une fraction sérique riche en convertine(VII), facteur Stuart(X) et facteur anti-hémophilique B(IX). Fraction CSB. Etude expérimentale chez le lapin.
- Nouv. Rev. Franç. Hémat., 2, 1, 27, 1962

119- SOULIER (J.P), BLATRIX (C), STEINBUCH (M)
Fractions "coagulantes" contenant les facteurs de coagulation adsorbables par le phosphate tricalcique.
- Presse Médicale, 72° année, 21, 1223, 1964

../...

120- SOULIER (J.P), PROU-WARTELLE (O)
Staphylocoagulase and prothrombin.
- in : suppl. 2o ad Thromb. Diath. Haemorrh., 1966, p. 255 (Diffuse Intravascular Clotting)

121- SOULIER (J.P), PROU-WARTELLE (O)
Etude comparative des taux de co-facteur de la staphylocoagulase(CRF) et des taux de facteur II (prothrombine) dans diverses conditions.
- Nouv. Rev. Franç. Hémat., à paraître.

122- SOULIER (J.P), PROU-WARTELLE (O)
Etude de la thrombine-coagulase.
- Thromb. Diath. Haemorrh., à paraître

123- STAVITSKY (A.B), INGRAHAM (J.S)
Haemagglutination and haemagglutination-inhibition reactions with tannic acid and bis-diazoted benzidine-protein-conjugated erythrocytes.
- in : Immunological Methods, Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1964, p. 363

124- STORB (U), CORVAZIER (P), KÜNZER (W)
Fetalis Fibrinogen.IV-Mitteilung. Untersuchungen zum immunologischen und physico-chemischen Verhalten des Neugeborenen-Fibrinogens.
- Klin. Wochenschrift, 43, 9, 488, 1965

125- STORMORKEN (H)
Species differences of clotting factors in ox, dog horse, and man. Thromboplastin and proconvertin.
- Acta Physiol. Scand., 41, 3o1, 1957

126- STRAUB (P.W)
A study of fibrinogen production by human liver slices in vitro by an immunoprecipitin method.
- J. Clin. Invest., 42, 1, 13o, 1963

127- STREULI (F)
On the purification and conversion of human prothrombin.
- Thromb. Diath. Haemorrh., 3, 2/3, 194, 1959

128- SVEJGARD (A)
Circulating anticoagulant in a haemophiliac (Evidence for antibody nature).
- Scand. J. Haemat., 3, 227, 1966

129- TAGER (M), DRUMMOND (M.C)
Staphylocoagulase.
- Ann. New York Acad. Sci., 128, 92, 1965

130- TARVER (H.W), REINHART (W.O)
Methionine labelled with radioactive sulphur as an indicator of protein formation in the hepatectomized dog.
- J. Biol. Chem., 167, 395, 1947

131- TOCANTINS (L.M), KAZAL (L.A)
Blood Coagulation, hemorrhage and thrombosis,p. 159, Grune et Stratton (New York/London) ed., 1964

132- de VRIES (A),ROSENBERG (T),KOCHWA (S),BOSS (J.H)
Precipiting antifibrinogen antibodies appearing after fibrinogen infusions in a patient with congenital afibrinogenemia.
- Am. J. Med., 3o, 486, 1961

133- WADSWORTH (C)
A slide microtechnique for the analysis of immune precipitates in gel.
- Int. Arch. Allergy, 1o, 355, 1957

134- WADSWORTH (C), HANSON (L.A)
Comparative analysis of immune electrophoretic precipitates employing a modified immune electrophoretic technique.
- Int. Arch. Allergy, 17, 165, 196o

136- WARE (A), FAHEY (J), SEEGERS (W)
Platelet extracts, fibrin formation and interaction of purified prothrombin and thromboplastin.
- Am. J. Physiol., 154, 14o, 1948

137- WEILLAND (C), SOULIER (J.P)
Purification de la prothrombine par la bentonite.
- Path. Biol., 7, 23/24, 2531, 1959

138- WHITE (J.G), KRIVIT (W), VERNIER (R)
An ultrastructural investigation of the fibrin clot utilizing ferritin-labelled anti-human fibrinogen antibody.
- Blood, 24, 4, 443, 1964

139- WIEME (R.J)
Studies on agar-gel electrophoresis. Techniques, applications.
- Arscia Uitgaven N.V., Bruxelles, 1959, p. 188

146- WILSON (M.W), PRINGLE (B.H)
Experimental studies of the agar plate precipitin test of Ouchterlony.
- J. Immunol., 73, 4, 232, 1954

Vu, le Président de Thèse,

Jean BERNARD.

Vu, le Doyen de la Faculté,

G. BROUET.

Vu et permis d'imprimer

Le Recteur de l'Académie de Paris,

J. ROCHE.